

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Markus Pappa

**PCR-MEETODI VALIDEERIMINE *SALMONELLA SPP.*
TUVASTAMISEKS TOIDU- JA KESKKONNAPROOVIDEST**

Magistritöö

Juhendajad

Ene Talpsep, MSc

Eerik Jõgi, MSc

Tartu 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 <i>Salmonella</i> üldkirjeldus	7
1.1.1 <i>Salmonella</i> levik	8
1.1.2 <i>Salmonelloos</i> ja patogeensus	10
1.1.3 <i>Salmonella</i> nakatumisannus	13
1.2 <i>Salmonella spp.</i> diagnostika toidust ja keskkonnaproovidest PCR-meetodil.....	13
1.2.1 PCR'i kontrollreaktsioonid.....	16
1.2.2 <i>Salmonella spp.</i> spetsiifilised ja 16S rRNA praimerid	17
1.3 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks kasutatava alternatiivmeetodi valideerimine	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjal ja meetodika	21
2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved	21
2.2.2 Töös kasutatud toidumaatriksid ja keskkonnaproovid	22
2.2.3 Bakterite kasvatamine.....	23
2.2.4 Referent- ja alternatiivmeetodi võrdlev katseskeem	24
2.2.5 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamist kinnitavad testid vastavalt referentmeetodi standardile EVS-EN ISO 6579:2003	25
2.2.6 Toidumaatriksite ja keskkonnaproovide kunstlik nakatamine	25
2.2.6.1 Bakterikultuuri kasvatamine ja nakatamiseks kasutatava inokulaadi valmistamine	25
2.2.6.2 Katseproovide kunstliku nakatamise ja rikastamise toimingud	26
2.2.6.3 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamine kakao- ja šokolaaditoodetest.....	27
2.2.6.4 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamine maitseainetest.....	28
2.2.6.5 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamine lihatoodetest.....	28
2.2.6.6 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamine kanalihast	28

2.2.6.7 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamine keskkonnaproovidest	29
2.2.7 Bakteriaalse DNA eraldamine	29
2.2.8 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	29
2.2.8.1 Töös kasutatud praimerid	29
2.2.8.2 Töös kasutatud arvutiprogrammid ja veebilehed praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 analüüsiks ja iseloomustamiseks	30
2.2.8.3 PCR-metoodika valideerimisel kasutatud plasmiidid	30
2.2.8.4 PCR-meetodis kasutatud negatiivsed kontroll ja positiivsed kontrollid	31
2.2.8.5 PCR-meetodi valideerimisel kasutatud reaktiivid	31
2.2.8.6 PCR optimeerimine	32
2.2.8.7 Bakteriaalse DNA eraldamise kontroll	33
2.2.8.8 PCR-produktide visualiseerimine ja kontrollimine	34
2.2.9 Alternatiiv- ja referentmeetodi tulemuste võrdleval analüüsil määratavad parameetrid	34
2.3 Tulemused	36
2.3.1 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks kasutatavate praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 bioinformaatiline analüüs	36
2.3.2 PCR-meetodi optimeerimine	37
2.3.2.1 PCR-reaktsiooniks sobivaima MgCl ₂ kontsentratsiooni määramine	37
2.3.2.2 Positiivse kontrollplasmidi ja IAC-plasmidi molekulide arvu optimeerimine PCR-reaktsiooniks	39
2.3.2.3 Positiivse kontrollina kasutatava <i>Salmonella spp.</i> genoomse DNA optimaalse lahjenduse leidmine	41
2.3.2.4 Sobiva PCR-programmi arendamine <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest	42
Optimeeritud PCR-meetod <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest	44
2.3.3 <i>Salmonella spp.</i> PCR-meetodi analüüsitulemused	45
2.3.3.1 PCR'i analüüsitulemused <i>Salmonella spp.</i> tuvastamisel kakao- ja šokolaaditoodetest	45
2.3.3.2 PCR'i analüüsitulemused <i>Salmonella spp.</i> tuvastamisel maitseainetest	46
2.3.3.3 PCR'i analüüsitulemused <i>Salmonella spp.</i> tuvastamisel lihast	48
2.3.3.4 PCR'i analüüsitulemused <i>Salmonella spp.</i> tuvastamisel kanalihast	49

2.3.3.5 PCR'i analüüsitulemused <i>Salmonella spp.</i> tuvastamisel keskkonnaproovidest...	50
2.3.4 Referentmeetodi ja PCR-meetodi (alternatiivmeetodi) võrdlev analüüs <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks.....	52
2.3.4.1 <i>Salmonella spp.</i> tuvastamiseks kasutatava referentmeetodi ja PCR-meetodi (alternatiivmeetodi) võrdleva analüüsi tulemused.....	52
2.3.4.2 Suhtelise tuvastamiskiiruse määramine	54
2.3.4.3 PCR-meetodi selektiivsus ja spetsiifilisus.....	55
2.4 Arutelu	58
KOKKUVÕTE	62
SUMMARY	64
TÄNUAVALDUSED.....	66
KASUTATUD KIRJANDUS.....	67
KASUTATUD VEEBILEHED	76
LISA	77
Lisa 1. PCR-meetodi optimeerimise protsessis testitud kommertsiaalsed PCR valmissegud...	77
Lisa 2. PCR valmissegu <i>5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 10 mM (või 7,5 mM; 12,5 mM) MgCl₂</i> reaktsioonisegu koostis.....	77
Lisa 3. Praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 iseloomustus.....	77
Lisa 4. Analüüsitava maatriksi inokuleerimisskeem, katseproovide arv ja analüüsi tulemus...	80
Lisa 5. Töös kasutatud varem kujundatud PCR programmid.....	83
Lisa 6. Referent- ja alternatiivmeetodi analüüsi tulemused selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramiseks; <i>Salmonella</i> märklaud ja mitte-märklaud tüved.....	84
Lisa 7. Meetodite suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja suhtelise spetsiifilisuse tulemused (2012 – 2014 aasta analüüside põhjal).....	86
LIHTLITSENTS.....	88

KASUTATUD LÜHENDID

ATCC – *American Type Culture Collection* (Ameerika tüüpi kultuurikollektsioon)

CELMS – *Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains* (Keskkonna ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioon)

cfu – *colony-forming unit* (kolooni moodustav ühik)

EFSA – *European Food Safety Authority* (Euroopa Toiduohutusamet)

IAC – internal amplification control (sisemine amplifikatsiooni kontroll)

KA – kõrge arvukus

MA – madal arvukus

MQ – deioniseeritud vesi (ddH₂O)

SPI – *Salmonella* pathogenicity island (*Salmonella* patogeensuse saar)

TP – tuvastamiskiir

VTL – Veterinaar- ja toidulaboratoorium

SISSEJUHATUS

Salmonella on *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluv patogeensete bakterite perekond, mille erinevad serotüübid (üle 2600) on ühed ohtlikumad ning sagedasemad toidus esinevad infektsioonitekitajad ja seda nii arengumaades kui ka arenenud maades (Bhunia, 2008). *Salmonella spp.* serotüübid on erinevatele füüsikalistele ja keemilistele mõjuritele suhteliselt vastupidavad, mistõttu nad suudavad elada ja kasvada väga erinevates keskkondades. Enam kui 95% salmonelloosi juhtudest on toidutekkelised (Mead *et al.*, 1999). Salmonelloosi tekitamiseks vajaminev nakatamise annus on varieeruv ja sõltub serotüübist, nakatava indiviidi vanusest ja üldisest tervislikust seisundist (Champoux *et al.*, 2004). Igal aastal nakatub salmonelloosi miljoneid inimesi ja paljudel juhtudel võib lõppeda see ka surmaga.

Salmonella bakterite tuvastamiseks kasutatakse kõige enam traditsioonilist, mikrobioloogilist meetodit. Traditsiooniliste meetoditega kulub negatiivse tulemuse kinnitamiseks vähemalt 3 päeva ja positiivse tulemuse kinnitamiseks kuni 5 päeva. Seetõttu vajatakse kiiremaid, kuid vähemalt sama usaldusväärseid alternatiivmeetodeid, mis suudaksid *Salmonella spp.* tuvastada ka erinevatest toidumaatriksitest.

Üheks sobivaimaks alternatiiviks võib tänapäeval pidada PCR-meetodit. Toidupatogeenide, eeskätt *Salmonella spp.* tuvastamiseks, on arendatud erineva tundlikkuse ja efektiivsusega tuvastamissüsteeme, kuid PCR põhised standardmeetodid puuduvad. PCR-meetod võimaldab suhteliselt kiiret, umbes 24 tunni jooksul saadavat analüüsitulemust, mille puhul enamuse aega kulub (sarnaselt referentmeetodile - mikrobioloogilise meetodile) katseproovi eelrikastamiseks erinevates mitteselektiivsetes puljongites. Vastavalt meetodika optimeeritavusele võib PCR põhine alternatiivmeetod olla kiire, selektiivne ja hea tuvastustundlikkusega, mis on vajalik eeskätt toiduainetööstuses tootmishügieeni kontrolliks ja toiduohutuse tagamiseks.

Käesolevas töös antakse ülevaade *Salmonella spp.* omadustest, eripäradest ning kirjeldatakse PCR-meetodika valideerimise protsessi. Lisaks hõlmab magistritöö PCR-meetodi optimeerimist. PCR-meetodi valideerimiseks kasutati alternatiivmeetodite kinnitamiseks ettenähtud rahvusvahelises standardis EN ISO 16140:2003 kehtestatud normatiive. Valideerimine oli eelduseks PCR-meetodi akrediteerimisele Icosagen AS mikrobioloogia laboris *Salmonella spp* tuvastamiseks toidust ja keskkonnaproovidest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Salmonella* üldkirjeldus

Salmonella on *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluv patogeensete bakterite perekond, mille liikide ja alamliikide süstematiseerimine põhineb biokeemilistel ja seroloogilistel tunnustel, geneetilise sarnasuse ning elukeskkonna hindamisel (D'Aoust, 2000; EFSA, 2010; Scherer ja Miller, 2001). Eristatakse kahte *Salmonella* liiki: *S. enterica* ja *S. bongori* (Bhunia, 2008; Rao *et al.*, 2006; Scherer ja Miller, 2001). *Salmonella enterica* jaotub omakorda kuueks alamliigiks, kuhu kuuluvad *S. enterica* (I), *S. salamae* (II), *S. arizonae* (IIIa), *S. diarizonae* (IIIb), *S. houtenae* (IV) ja *S. indica* (VI) (Bhunia, 2008; Grimont ja Weill, 2007; Porwollik, 2004; Su ja Chiu *et al.*, 2007). Alamliikidele *S. enterica* (I) ja *S. salamae* (II) on tavaliseks elupaigaks püsisoojased loomad. Seevastu IIIa, IIIb, IV, VI alamliikidele ja liigile *S. bongori* (V) on elupaigaks kõigusoojased loomad ning keskkond (Grimont ja Weill, 2007; Pui *et al.*, 2011).

Aegade jooksul on *Salmonella* klassifitseerimiseks kasutatud erinevaid nomenklatuuri süsteeme. Ajalooliselt kõige varasem meetod põhineb *Salmonella* nimetamisel algupärase isoleerimise koha järgi nagu näiteks *S. London*, *S. Dublin*, *S. Indiana* (Bhunia, 2008). Tänapäeval kasutatakse *Salmonella* klassifitseerimiseks ka bakteriofaagide tüpiseerimismeetodit, mis põhineb bakterite erineval tundlikkusel bakteriofaagide suhtes (Bhunia, 2008; Hanes, 2003). Euroopas kasutatakse peamiselt White-Kauffmann-Le "Minor" skeemi (Grimont ja Weill, 2007). Kauffmann-White'i skeemi järgi, mis põhineb antigeenide ("*O*", "*H*", "*K*") määratlemisel, toimub *Salmonella* isolaatide kinnitamine ja klassifitseerimine serotüüpideks (Grimont ja Weill, 2007). Termotabiilse "*O*" antigeeni tüüp määratakse lähtudes lipopolüsahhariididega seotud oligosahhariididest (Scherer ja Miller, 2001; Champoux *et al.*, 2004). Spetsiifiliste *Salmonella* "*H*" antigeenide määratlemine põhineb termolabiilsetel viburivalkudel (Pui *et al.*, 2011). Tavaliselt ekspresseeritakse kahte erinevat "*H*" antigeeni, millest tulenevalt omavad nad kahte erinevat liikumisvõimelist faasi (kahefaasiline vorm) (Chiou *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2000; Champoux *et al.*, 2004). Levinud on ka monofaasilised, harvem kolme- ja rohkemafaasilised vormid (toimub kolme või enama flagelliini geeni ekspressioon) (EFSA, 2010; Smith ja Selander, 1991). Juhul kui puudub mõlema "*H*" antigeeni ekspressioon on *Salmonella* bakter liikumatu (EFSA, 2010). Lisaks eelpool mainitud antigeenidele leidub serotüüpidel *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C ja *Salmonella* Dublin veel "*Vi*" antigeen (EFSA, 2010), mis on kapsli "*K*" antigeeni alamtüüp (Champoux *et al.*, 2004; Grimont ja Weill, 2007; Scherer ja Miller, 2001).

Antud hetkel on teada üle 2600 *Salmonella* serotüübi (Guibourdenche *et al.*, 2009) ja on leitud, et rohkem kui 99,5% *Salmonella* isolaatidest moodustavad *S. enterica* (I) serotüübid (Grimont ja Weill, 2007).

Salmonella perekonda kuuluvad bakterid on 0,7-1,5 µm diameetriga ja 2-5 µm pikkused (Bell ja Kyriakides, 2002), asporogeensed, gramnegatiivsed, enamasti viburitega varustatud pulkbakterid. Suur osa *Salmonella* serotüüpidest on liikuvad, eranditeks on *S. Pullorum* ja *S. Gallinarum* (Bell ja Kyriakides, 2002; Bhunia, 2008). Kõik *Salmonella* bakterid on intratsellulaarsed patogeenid (Bhunia, 2008). Toitumistüübilt on tegu kemoorganotroofidega ja hingamistüübilt fakultatiivsete anaeroobidega (Gray ja Fedorka-Cray, 2002; Montville ja Mathhews, 2008). *Salmonella* bakterid on vähenõudlikud ja suudavad elada erinevates keskkonnatingimustes, sealhulgas ka peremeesorganismi väliselt (Barrell, 1988; Gray ja Fedorka-Cray, 2002; Guan ja Holley, 2003). Nad on laktoosi mittelagundavad (Gray ja Fedorka-Cray, 2002), glükoosi kääritavad, nitraati nitritiks redutseerivad, oksüdaasnegatiivsed bakterid (Hanes, 2003). *Salmonella* spp. ei vaja elutegevuseks NaCl (Hanes, 2003) ning nad ei talu kõrget soolakontsentratsiooni (Jay *et al.*, 2005). On leitud, et soolalahus kontsentratsiooniga >9% omab patogeenile bakteritsiidset toimet (Jay *et al.*, 2005). *Salmonella* bakterid suudavad elada temperatuurivahemikus 5-47 °C (Andrews ja Baumler, 2005) ning pH vahemikus 3,6-9,5 (Hui *et al.*, 2002). Mesofiilidena on nende elutegevuse optimaalseks temperatuurivahemikuks 35-37 °C ja sobivaks pH vahemikuks 6,5-7,5 (Andrews ja Baumler; Bhunia, 2008; 2005; Hanes, 2003; Hui *et al.*, 2002). Ekstreemsetel temperatuuridel 4-8 °C või 44 °C ning pH väärtustel 4,4 või 9,4 moodustavad nad pikki filamente (Bhunia, 2008). *Salmonella* on temperatuuritundlik ja hävib tavaliselt temperatuuril ≥70 °C (Hanes, 2003). Samuti hävib patogeen toidu läbikeetmisel ja -praadimisel, piima (71,7 °C ~15 sek) ning puuviljamahlade (70-74 °C ~20 sek) pastöriseerimisel (Gray ja Fedorka-Cray, 2002).

1.1.1 *Salmonella* levik

Salmonella bakterid on maailmas ühed ohtlikumad ning sagedasemad toiduga levivatest patogeenidest, seda nii arengumaades kui ka arenenud maades (Bhunia, 2008). *Salmonella* spp. on laialt levivinud erinevates keskkondades nagu näiteks vees ja mullas ning loomade soolestikus (Hui *et al.*, 2002). Nende võime kohaneda ekstreemsete tingimustega muudab nad küllaltki vastupidavaks toidutöötlustele (D'Aoust *et al.*, 2001). Seepärast peetakse *Salmonella*

spp. jätkuvalt üheks peamiseks patogeeniks toiduohutuse tagamisel. *Salmonella spp.* patogeeni on isoleeritud putukatest, erinevatest püsi- ning kõigusoojastest loomadest (Hanes, 2003). *Salmonella* perekonna bakteritega võivad nakatuda ja olla kandjateks nii inimesed kui ka kõik teadaolevad mets- ja koduloomad, samuti linnud, putukad, kahepaiksed ning roomajad (Bhunia, 2008; Hui *et al.*, 2002; Scherer ja Miller, 2001). Hinnanguliselt on 95% kõigist *Salmonella* infektsioonidest toidutekkelised (Mead *et al.*, 1999). Haigustekitajad levivad inimeselt-inimesele enamasti fekaal-oraalsel teel (Champoux *et al.*, 2004; Hanes, 2003). Inimeste puhul peetakse *Salmonella* bakteriga nakatumise peamiseks põhjusteks patogeeni kandva looma, inimese või linnu roojaga saastunud toidu söömist ja nakatunud toorpiima ning vee joomist (Andrews ja Baumber, 2005; Bell ja Kyriakides, 2002; D'Aoust, 2000; Jay *et al.*, 2005). Toidumaatriksitest on levinumateks nakkusallikateks linnuliha, sealihaga ning kanamunad (D'Aoust, 1991; Hanes, 2003). Patogeeni on leitud ka puu- ja köögiviljade (Hui *et al.*, 2002), šokolaadi (Cordier, 1994; Kapperud *et al.*, 1990) ning maitseainetega (Zweifel ja Stephan, 2012) seotud haiguspuhangute korral. Sageli levib *Salmonella spp.* ristsaastumise teel, kui toores looma- või linnuliha puutub töötlemise käigus kokku valmistoiduga nagu näiteks salatiga (Bouchrif *et al.*, 2009). Eestis on *Salmonella spp.* leitud erinevatest toidumaatriksitest, kuid peamiselt on patogeeni isoleeritud tooretelt kanamunadest, lihatoodetest ja toorest lihast (Kramarenko *et al.*, 2014). Toore liha puhul leiti *Salmonella spp.* kõige enam kalkuni- ja kanalihast (Kramarenko *et al.*, 2014). Samas võib *Salmonella* ristinfektsioon toimuda ka kuivainete (näiteks munapulber ja tolm) vahendusel läbi õhu (Hanes, 2003).

Maailmas on enam levivateks serotüüpideks *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi* ja *S. Paratyphi* (Su ja Chiu, 2007). Ajavahemikul 2008-2012 olid Eestis enam esinevateks serotüüpideks toidus ja toiduainetes *S. Typhimurium* (26,9%), *S. Derby* (17,5%), *S. Enteritidis* (8,37%) ning *S. Newport* (7,57%) (Kramarenko *et al.*, 2014). Kokku isoleeriti sellel ajavahemikul 26 erinevat *Salmonella* serotüüpi. *Salmonella spp.* poolt põhjustatud haigusjuhtude arv Eestis ajavahemikul 2009-2013 ja neid põhjustanud serotüüpide esinemissagedused on näidatud Tabelis 1.

Tabel 1. *Salmonella* spp. poolt põhjustatud haigestumiste arv Eestis ajavahemikul 2009-2013 ja salmonelloosi põhjustanud serotüüpide esinemissagedused (Terviseamet, Veebileht 5).

<i>Salmonella</i> spp. serotüüp	Haigusjuhtumite arv 2009/ serotüübi esinemissagedus Eestis	Haigusjuhtumite arv 2010 /serotüübi esinemis-sagedus Eestis	Haigusjuhtumite arv 2011 /serotüübi esinemissagedus Eestis	Haigusjuhtumite arv 2012 /serotüübi esinemissagedus Eestis	Haigusjuhtumite arv 2013 /serotüübi esinemissagedus Eestis
<i>S. Enteritidis</i>	261/78,2%	414/69,6%	385/59,7%	287/63,4%	186/63,4%
<i>S. Typhimurium</i>	261/9,9%	414/12,1%	385/10,6%	287/8,4%	186/8,4%
<i>S. Agona</i>	261/0,4%	414/1,5%	385/0,5%	287/0	186/13,4%
<i>S. Derby</i>	261/0	414/0	385/0,7%	287/0	186/5,4%
<i>S. Infantis</i>	261/0,8%	414/1,0%	385/5,7%	287/0,7%	186/3,2%
<i>S. Heidelberg</i>	261/0	414/0	385/0	287/0	186/0,5%
<i>S. Newport</i>	261/0,4%	414/0	385/0	287/0	186/0,5%

1.1.2 Salmonelloos ja patogeensus

Salmonella spp. poolt põhjustatud haigust nimetatakse salmonelloosiks. Infektsiooni tekkimiseks ekspresseerivad *Salmonella* bakterid mitmeid geene, mis kodeerivad erinevaid virulentsusfaktoreid (Bhunia, 2008; Champoux *et al.*, 2004; Valdez *et al.*, 2009). Enamus neist sekreteeritakse kahe erineva tüüpi kolm sekretsioonisüsteemi abil (T3SS), mida kodeerivad *Salmonella* patogeensususe saared (SPI) 1 ja 2 (Bhunia, 2008; Champoux *et al.*, 2004; Valdez *et al.*, 2009). Esimene sekretsioonisüsteem vastutab mittefagotsüütsete rakkude invasiooni, soolestiku koloniseerimise ja põletiku tekkimise eest (Bhunia, 2008; Valdez *et al.*, 2009). Teise sekretsioonisüsteemi ülesandeks on indutseerida süsteemset haigust ja tagada makrofaagides ellujäämine (Bhunia, 2008; Valdez *et al.*, 2009). Teistes patogeensususe saartes asuvad geenid vastutavad enteropatogeensususe, raua omastamise ja antibiootikumide resistentsuse eest (Bhunia, 2008). Transkriptsiooni regulaator HilA reguleerib geenide ekspressiooni, mis on seotud invasiooniga (Bhunia, 2008; Valdez *et al.*, 2009). Infektsiooni tekitades peavad *Salmonella* bakterid suutma ellu jääda erinevates tingimustes ja kohaneda faktoritega nagu näiteks maohape, sapisoolad, hapnikuvaegus, toitainete puudus, antimikroobsete peptiidide olemasolu, lima ning loodusliku mikrofloora konkurents (Bhunia, 2008; Valdez *et al.*, 2009). Arvatakse, et sigma faktor RpoS, reguleerides enam kui 60 valgu ekspressiooni, aitab *Salmonella* bakteritel nendes tingimustes ellu jääda (Bhunia, 2008).

Salmonellooside peamisteks sümptomiteks on oksendamine, kõrge palavik, kõhulahtisus, dehüdratatsioon ja krambid (Champoux *et al.*, 2004; Gray ja Fedorka-Cray, 2002; Hanes, 2003). Haiguse kulgemine sõltub enamasti serotüübi virulentsusest, nakatumisannusest ja peremeesorganismi üldisest tervislikust seisundist (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Lähtuvalt salmonelloosi sümptomite muistrist saab haigusjuhud jagada tinglikult neljaks. Eristatakse tüfoidset palavikku, gastroenteriiti, baktereemiat (Bhunja, 2008; Champoux *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2011), kroonilist nakkuskandlust ja teisi mitte-tüfoidsete serotüüpide poolt põhjustatud komplikatsioone (Pui *et al.*, 2011). Hinnanguliselt esineb igal aastal 16 miljonit tüfoidse palaviku ja 1,3 miljardit gastroenteriidi ülemaailmset juhtumit (Bhunja, 2008). Euroopas registreeritakse iga-aastaseid salmonelloosi juhtumeid üle 100 000 (EFSA, Veebileht 2), Eestis 200-300 (Terviseamet, Veebileht 5). Suurema osa salmonellooside põhjustajateks inimestel on ülemaailmselt serotüübid *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ja *S. Heidelberg*. Samas võib serotüüpide esinemissagedus erinevates toitudes ja loomades aastate lõikes erineda (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Aastal 2013 oli Eestis 186 salmonelloosi juhtumit, millest 63,4% oli tekitajaks *S. Enteritidis*, 13,4% *S. Agona* ja 8,4% *S. Typhimurium* (Terviseamet, Veebileht 5).

Baktereemia on tõsine haigusseisund, kui bakterid on tunginud läbi soolestiku vereringesse. Kõigist ravita jäetud salmonelloosi juhtumitest on hinnanguliselt 8% tagajärjeks baktereemia (Scherer ja Miller, 2001). Baktereemia peamiseks tekitajaks on *S. Choleraesuis*, mille puhul esineb väga kõrge suremus (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Omandatud immuunpuudulikkuse sündroomiga (AIDS) patsientidel on *Salmonella* nakkus tavaliseks ning raskesti kulgevaks haiguseks. Enam kui 70% neist patsientidest esineb baktereemia, mis põhjustab septilist šokki ja võib lõppeda surmaga (Champoux *et al.*, 2004). Lümfoproliferatiivset haigust põdevad inimesed on samuti väga vastuvõtlikud salmonelloosidele. Arvatakse, et see tuleneb T-rakkude defektidest, mis on sarnased AIDS'ga patsientidele. Lisaks on baktereemiahaigetel kõrgem risk metastaaside levikuks (Champoux *et al.*, 2004), mis tuleneb *Salmonella* unikaalsest võimest ja tendentsist koloniseerida organismis vigastatud kudesid ning juba teiste haiguste poolt kahjustatud piirkondi (Hanes, 2003).

Tüfoidset palavikku (paratüüfust ja kõhutüüfust) põhjustavad *S. Typhi* ja *S. Paratyphi* (A,B,C), millest viimase tekitatud haiguskulg on kergekujulisem ja haigusjuhtude arv ning suremus väiksem (Champoux *et al.*, 2004; Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Tüfoidne palavik on salmonelloosidest kõige pikema inkubatsiooniajaga, tekitab kõrgeimat palavikku ja on suurima

suremusega (Jay *et al.*, 2005). Serotüübiga *S. Typhi* nakatuvad ainult inimesed (Champoux *et al.*, 2004). Tavaliselt saadakse tüfoidne palavik kokkupuutest nakatunud inimese roojaga (Bhunia, 2008; Champoux *et al.*, 2004).

Gastroenteriiti (enterokoliit) ehk soolepõletikku põhjustavad kõik mitte-tüfoidsed *Salmonella* serotüübid. Kõige sagedasemateks enterokoliidi tekitajateks inimestel ja loomadel on serotüübid *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ja *S. Newport* (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Enterokoliit on maailmas kõige levinum *Salmonella* bakterite poolt põhjustatud nakkus ning on peaaegu alati toidumürgistuse tagajärg (Champoux *et al.*, 2004).

Salmonella bakterid levivad ka krooniliste nakkuskandjatega, kes võivad nakatada väga paljusid inimesi. Kroonilistel nakkuskandjatel ei pruugi haigussümptomid avalduda. Kroonilise kandluse tegureid ja mehhanisme ei ole tänaseks veel suudetud täielikult välja selgitada. On leitud, et mitte-tüfoidsed serotüübid püsivad seedetraktis keskmiselt 6 kuni 12 nädalat (sõltuvalt serotüübist) ja kõigest 0,1% mitte-tüfoidsete haigusjuhtude puhul eritub patogeene fekaalide kaudu üle aasta (Scherer ja Miller, 2001). Krooniline nakkuskandlus tekib umbes 2-5% tüfoidsete infektsioonide ravimata jätmise tagajärjel (Scherer ja Miller, 2001).

Salmonelloosi esialgne ravi sõltub suuresti patsiendi seisundist ja sümptomitest. Enamasti manustatakse vedelikukaotuse korral tilgutiga toitelahust, ravimitest määratakse need, mis on patsiendi seisundit arvesse võttes sobivad (Champoux *et al.*, 2004; Hanes, 2003). Antimikroobset ravi rakendatakse juhul, kui nakkus on tõsine või muutunud süsteemseks, või juhul kui soovitakse ennetada haiguse süsteemset levikut erinevate riskiteguritega patsientidel (Bhunia, 2008; Champoux *et al.*, 2004). Üldiselt antibiootikumiravi ei rakendata, kuna see ei lühenda haiguskulgu ja võib hoopis suurendada kroonilise nakkuskandluse esinemissagedust (Champoux *et al.*, 2004; D'Aoust, 1991; Hanes, 2003). Tänapäeval on järjest suuremaks probleemiks *Salmonella spp.* ravimresistentsus ning üha enam on kasvanud vajadus uute antibiootikumide järele (Champoux *et al.*, 2004; D'Aoust, 1991; Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Paljusid patogeensusega seotud molekulaarseid mehhanisme on suudetud selgitada tänu millele on võimalus arendada spetsiifilisi *Salmonella* vastaseid antibiootikume ning antimikroobseid ühendeid (Scherer ja Miller, 2001).

1.1.3 *Salmonella* nakatumisannus

Salmonella nakatumisannus varieerub suuresti, jäädes vahemikku $1-10^9$ cfu/g (Bell ja Kyriakides, 2002; Champoux *et al.*, 2004; Jay *et al.*, 2005; Yousef ja Carlstrom, 2003). Erinevate haiguspuhangute puhul on leitud, et salmonelloosi võib nakatuda ka juhul, kui nakatamisannus on $1-10$ cfu/g (Yousef ja Carlstrom, 2003). Näiteks on leitud, et USA-s 1994. aastal toimunud massilise salmonelloosi puhangu puhul oli nakatunud jäätise puhul nakatumisannus väga madal, kõigest 1 cfu/g (Vought ja Tatini, 1998). Enamasti on infektsiooni tekkimiseks vajalikuks nakatumisannuseks enamasti suurusjärg $>10^3$ bakterirakku, mis võib erinevate tegurite mõjul olla ka väiksem (Champoux *et al.*, 2004). Keskmiseks *Salmonella spp.* nakatumisannuseks on 10^5-10^6 bakterirakku (Champoux *et al.*, 2004; Kothary ja Babu, 2001), kuid kapsli "Vi" antigeeniga *S. enterica* serotüüpidel on see madalam (Champoux *et al.*, 2004). Nakatumisannus on varieeruv sõltuvalt serotüübist, nakatava indiviidi vanusest ja tervislikust seisundist. Kõige vastuvõtlikumad on alla 5 aastased lapsed, 20-30 ja üle 70 aastased ning kroonilisi haigusi põdevad inimesed (Bhunia, 2008; Champoux *et al.*, 2004; Yousef ja Carlstrom, 2003). Katsed on näidanud, et loomadel on infektsiooni tekkimiseks vajaminev nakatumisannus suurem kui inimestel, jäädes enamasti vahemikku 10^6-10^9 bakterirakku (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Surmaga lõppevate salmonellooside puhul peab nakatumisannus olema isegi suurem. Samas on leitud, et infektsiooni ilmnemiseks vajaminev patogeeni annus väheneb drastiliselt, kui loomad või inimesed põevad samaaegselt viirushaigust (Gray ja Fedorka-Cray, 2002). Kliiniliselt on loomade salmonelloosi sümptomid ja haigusilmingud sarnased inimestele. Näiteks veisekarja nakatumisel *S. Typhimurium* DT104'ga ilmneb veistel diarröa, isutus ja kaalulangus (Gray ja Fedorka-Cray, 2002).

Salmonelloosi ennetamiseks ja nakatumise riski vähendamiseks tuleks korralikult täita isiku hügieeni, toiduhügieeni ja ohutuid toidukäitlemise nõudeid.

1.2 *Salmonella spp.* diagnostika toidust ja keskkonnaproovidest PCR-meetodil

Traditsiooniliselt kasutatakse *Salmonella* tuvastamiseks toidust ja keskkonnaproovidest mikrobioloogilist meetodit, millega saadakse *Salmonella* mitteesinemist kinnitavad tulemused 72 h jooksul ja positiivsete tulemuste kinnitus alles 5-7 päevaga (Ferretti *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2003a). Mitmed mikrobioloogilised meetodid on rahvusvaheliselt tunnustatud staatusega nagu näiteks meetodid, mis on avaldatud Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (ISO) poolt.

Referentmeetod, mida Euroopas peamiselt *Salmonella spp.* tuvastamiseks kasutatakse, põhineb standardil EN ISO 6579:2003 (Toidu ja loomasöötade mikrobioloogia horisontaalmeetod *Salmonella spp.* tuvastamiseks) (ISO, 2003a). *Salmonella spp.* tuvastamiseks kasutatava standardmeetodi kohaselt testitakse 25 g toidus *Salmonella spp.* esinemist/puudumist rikastamisega mitteselektiivses puljongis (nt. BPW) ja selektiivpuljongites (nt. RVS, MKTTn) ning kasvatamisega selektiivsöötmetel (XLD; BGA). Sellele järgnevalt toimub eeldatavate *Salmonella spp.* tüvede seroloogiline ja biokeemiline kinnitamine (ISO, 2003a). Katseproove rikastatakse patogeeni arvukuse tõstmiseks, et võimaldada usaldusväärne analüüsitulemus nii referent- kui ka alternatiivmeetodil.

Kuigi mikrobioloogilised meetodid on tundlikud, selektiivsed ja tuvastavad ainult elusaid rakke, on need ka väga töömahukad ja aeganõudvad (ISO, 2003b). Seetõttu on tekkinud suur nõudlus alternatiivmeetodite järele, mis võimaldaksid eelkõige toidupatogeeni kiiremat tuvastamist. Ühe peamise alternatiivmeetodina kasutatakse *Salmonella spp.* kiiremaks tuvastamiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), millega on võimalik *Salmonella spp.* puudumist katseproovides tuvastada enamasti 24 h jooksul. Teaduskirjanduses on kirjeldatud mitmeid PCR-meetodil põhinevaid *Salmonella spp.* tuvastamissüsteeme keskkonnaproovidest (Makino *et al.*, 1999; Malorny *et al.*, 2003b; Pathmanathan *et al.*, 2003; Sánchez-Jiménez ja Cardona-Castro, 2004) ja erinevatest toidumaatriksitest nagu näiteks linnuliha (Gouws *et al.*, 1998; Malorny *et al.*, 2003b; Malorny *et al.*, 2004; Myint *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003), sealih (Ferretti *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2003b; Malorny *et al.*, 2004), loomaliha (Kwang *et al.*, 1996; Makino *et al.*, 1999; Malorny *et al.*, 2003b), puu- ja köögiviljasalatid (Radji *et al.*, 2010).

Salmonella bakterite tuvastamine toidust ja keskkonnaproovidest PCR-meetodil hõlmab analüüsitava materjali eelrikastamist mitteselektiivses ja vajadusel selektiivses rikastuspuljongis, *in vitro* spetsiifilis(t)e *Salmonella* DNA järjestus(t)e paljundamist PCR-meetodil, märklaudprodukti tuvastamist geelelektroforeesil (Lantz *et al.*, 1994; Lantz *et al.*, 2000). Alternatiivmeetodil saadud positiivse tulemuse korral kasutatakse tulemuse täiendavaks kinnitamiseks ja tüve tuvastamiseks referentmeetodit. See on vajalik epidemioloogilise seire ja erinevate riiklike programmide jaoks (ISO, 2003b). Tavaliselt on patogeensete bakterite, sh *Salmonella spp.*, arvukus toidus ja analüüsitavates naturaalses proovides liiga madal nukleiinhapete analüüsil põhinevate meetodite jaoks (Lantz *et al.*, 1994; Lantz *et al.*, 2000;

Odumeru ja León-Velarde, 2012). Selleks, et saada usaldusväärne *Salmonella spp.* tuvastamistulemus PCR-meetodil on vajalik proove eelrikastada (Lantz et al., 1994; Lantz et al., 2000; Oliveira et al., 2003). Eelrikastus võimaldab kahjustunud rakkude taastumist, patogeeni paljunemist ning surnud patogeeni rakkude kontsentratsiooni lahjendamist, millega vähendatakse valepositiivsete tulemuste saamise tõenäosust (Odumeru ja León-Velarde, 2012; Oliveira et al., 2003). Erinevate toidumaatriksite ja analüüsitavate proovide jaoks on arendatud erinevaid mitteselektiivseid eelrikastuspuljongeid, aga peamiselt kasutatakse *Salmonella spp.* tuvastamise protsessis ISO 6579:2003 standardi (Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia horisontaalmeetod *Salmonella spp.* tuvastamiseks) poolt soovitatavat puhverdatud peptoonvett (BPW). Enamasti on eelrikastusajaks 18 ± 2 h (ISO, 2003a; ISO, 2003b; Jasson et al., 2010), kuid on näidatud *Salmonella spp.* tuvastamist PCR-meetodil, kui eelrikastusaega on oluliselt lühendatud (4-6 h) (Ferretti et al., 2001; Gouws et al., 1998; Guo et al., 2000; Jitrapakdee et al., 1995; Kwang et al., 1996; Pathmanathan et al., 2003). Selliste meetodikate kasutamisel on saadud väga erineva efektiivsusega tulemusi, kuid universaalset meetodit pole veel standardiseeritud.

Mitmed erinevad toidu komponendid võivad inhibeerida termostabiilse DNA polümeraasi aktiivsust, põhjustada rakkude lüüsi või lagundada nukleiinhappeid (Lantz et al., 2000; Rossen et al., 1992; Wilson, 1997), mistõttu tuleb vastavalt analüüsitavale materjalile valida optimaalsed tuvastussüsteemi tingimused ja strateegiad (Lantz et al., 2000; Rådström et al., 2008). PCR-reaktsiooni efektiivsuse tõstmiseks on kirjeldatud mitmeid keemilisi ühendeid, mis võimaldavad edukalt vähendada PCR inhibiitorite mõju ja tõsta reaktsiooni spetsiifilisust ning stabiilsust (Al-Soud ja Rådström, 2000; Pomp ja Medrano 1991). PCR-reaktsiooni erinevate tingimuste optimeerimisega saab PCR-meetodi tundlikkust suurendada. Peamisteks PCR-meetodi optimeeritavateks parameetriteks on Mg^{2+} kationide kontsentratsioon, praimerite nukleotiidne järjestus ja nende seondumistemperatuur, PCR'i puhvri pH ning tsüklite arv (Roux, 2009; Zangenberg et al., 1999). PCR-meetodi puhul on analüüsi erinevate etappide juures tulemust mõjutavaid tegureid rohkem kui mikrobioloogilise meetodi puhul (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997), mis muudab alternatiivmeetodi valideerimise töömahukaks. Võib arvata, et seetõttu polegi toimunud toidulaborites n-ö alternatiivmeetodite laialdast revolutsiooni ning mikrobioloogilist meetodit peetakse endiselt "kuldseks standardiks".

Lisaks praimeritele, optimeeritud PCR'i programmile ja proovi ettevalmistamise juures kasutatavatele komponentidele võib patogeeni tuvastamine sõltuda veel paljuski analüüsitava

proovi omadustest ning nakatamistüübist (Ferretti *et al.*, 2001; Gouws *et al.*, 1998; Lantz *et al.*, 2000; Myint *et al.*, 2006; Soumet *et al.*, 1994). Kuna toidutöötlemine ja sanitatsioon võivad bakteritel põhjustada stressi, siis võib naturaalses proovides esinevate bakterite taastumine eelrikkustes võtta kauem aega kui kunstliku nakatamise puhul (Odumeru ja León-Velarde, 2012). Seega on naturaalselt nakatunud proovidele vajalik pikem inkubatsiooniaeg, kui seda on kunstlikult nakatatud proovidel.

Salmonella spp. usaldusväärse tuvastamistulemuse saamiseks PCR-meetodil on enamasti reaktsiooniks vajalik bakterirakkude arvukus suurusjärgus 10^2 - 10^3 cfu/ml (Jasson *et al.*, 2010). Erinevad katsed *Salmonella spp.* tuvastamiseks PCR-meetodil on näidanud, et antud metoodika töötab sama hästi ja võimaldab saada võrdväärseid tulemusi võrreldes klassikalise referentmeetodiga (Al-Harhi *et al.*, 2012; Ferretti *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003). Malorny *et al.*, (2003b) näitasid, et PCR-meetod on väga hea selektiivsuse ja kõrge tundlikkusega juhul kui 30-300 IAC molekuli kasutamisel oli *Salmonella spp.* tuvastamistundlikkus 5-50 cfu reaktsiooni kohta (Malorny *et al.*, 2003b).

1.2.1 PCR'i kontrollreaktsioonid

PCR'i meetodi kasutamisel toidupatogeenide tuvastamiseks on vajalik analüüsi toimimise kontrollimiseks kasutada kontrollproove: negatiivset ja positiivset kontrolli ning sisemist amplifikatsioonikontrolli (IAC). Negatiivne kontroll on uuritava DNA maatriksi vaba proov, millega kontrollitakse võimaliku kontaminatsiooni olemasolu ning reagentide puhtust. Positiivne kontroll seevastu sisaldab märklaud DNA-d, mille amplifikatsiooni produktiga on võimalik uuritava materjali analüüsi tulemusi võrrelda geelelektroforeesil (ISO, 2003b). IAC on märklaud-DNA järjestusega sama, kuid erineva pikkusega testitav DNA lõik, mida amplifitseeritakse samade (konkureeriva IAC) või erinevate (mittekonkureeriva IAC) praimeritega (Hoorfar *et al.*, 2004; ISO, 2005; Sachadyn ja Kur, 1998). Sisemise amplifikatsiooni kontrolli kasutamine võimaldab kontrollida PCR-reaktsioonide reprodutseeritavust, PCR aparatuuri töökorras olekut, erinevusi reaktsioonis kasutatavate reagentide ja DNA polümeraaside vahel ning välistada valenegatiivsed tulemused (ISO, 2005; Malorny *et al.*, 2003a; Sachadyn ja Kur, 1998). Eelkõige võimaldab IAC välja selgitada PCR-reaktsiooni inhibiitorite esinemist analüüsitavas DNA proovis (Hoorfar *et al.*, 2004; Malorny *et al.*, 2003a; Sachadyn ja Kur, 1998). Mittekonkureeriva IAC eeliseks võib pidada selle laialdast kasutamisevõimalust erinevate analüüside puhul (Hoorfar

et al., 2004). Konkureeriva IAC peamiseks eeliseks on see, et ei toimu erinevate praimerite vahelisi mittespetsiifilisi seondumisi (Hoorfar *et al.*, 2004). Samas peab selliselt disainitud IAC puhul hoolikalt optimeerima PCR-reaktsioonis kasutatavat hulka, et vältida valenegatiivsete tulemuste saamist läbi konkurentsi tekkiva inhibitsiooni (Hoorfar *et al.*, 2004; Malorny *et al.*, 2003a).

1.2.2 *Salmonella* spp. spetsiifilised ja 16S rRNA praimerid

Enamus spetsiifilistest sihtmärkgeenidest, mida *Salmonella* tuvastamiseks PCR-meetodil kasutatakse on seotud virulentsuse ja patogeensusega (Ziemer ja Steadham, 2003). *Salmonella* spp. tuvastamine PCR-meetodil põhineb *Salmonella* sihtmärkgeenide nagu näiteks *fliC* (flagelliin) ja *stn* (enterotoksiin) spetsiifiliste järjestuste ja ka juhuslike korduvate genoomsete fragmentide amplifitseerimisel (Ziemer ja Steadham, 2003). Tänapäevaks on kirjeldatud mitmeid erinevaid praimeripaare, mida kasutatakse *Salmonella* spp. genoomsete fragmentide paljundamiseks (Aabo *et al.*, 1993; Burkhalter *et al.*, 1995; Doran *et al.*, 1993; Kwang *et al.*, 1996; Makino *et al.*, 1999; Malorny *et al.*, 2003a; Oliveira *et al.*, 2003; Ziemer ja Steadham, 2003). PCR-reaktsiooni selektiivsuse ja tundlikkuse varieeruvus võib tuleneda analüüsitava maatriksi omadustest (Lantz *et al.*, 1994; Lantz *et al.*, 2000), tuvastatavatest serotüüpidest ning amplifitseeritavatest sihtmärkjärjestustest (Malorny *et al.*, 2003a).

Erinevate praimerite võrdlemisel on üheks paremini töötavaks ja paremat selektiivsust näitavaks praimeripaariks 139/141 (Malorny *et al.*, 2003a), mille sihtmärkgeeniks on spetsiifiline invasiooni-seoseline *invA*, mis asub SPI 1-s ning kodeerib T3SS valke (Malorny *et al.*, 2003a). Selle praimeripaari amplifitseeritava DNA fragmendi suuruseks on 284 bp (Rahn *et al.*, 1992). 139/141 praimeripaari on ulatuslikult testitud erinevate *Salmonella* serotüüpide ja mittemärklaudtüvede suhtes (Malorny *et al.*, 2003a; Rahn *et al.*, 1992) ning valideeritud erinevate toidumaatriksite ulatuses (Malorny *et al.*, 2003b). Lisaks on *Salmonella* spp. tuvastamiseks ulatuslikult testitud veel praimeripaari ST11/ST15, mille amplifitseeritavaks järjestuseks on juhuslik 429 bp genoomne fragment (Aabo *et al.*, 1993; Gouws *et al.*, 1998; Myint *et al.*, 2006). Aabo *et al.*, (1993) leidsid oma katsetega, et praimeripaar ST11/ST15 on kõrge spetsiifilisuse ja selektiivsusega.

Bakteriaalse DNA eraldamise kvaliteeti kontrollitakse PCR-reaktsiooniga, mille puhul kasutatakse spetsiifilisi eubakterite universaalseid primereid konserveerunud 16S rRNA geeni

üles amplifitseerimiseks (Clarridge, 2004; Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991). Praimeripaar PCRI ja PCRII amplifitseerivad 1500 bp 16S rRNA geeni DNA fragmendi, millega saadakse kinnitus bakteriaalse DNA esinemisest eraldatud proovis ning sobivusest PCR-reaktsiooniks (Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991).

1.3 *Salmonella* spp. tuvastamiseks kasutatava alternatiivmeetodi valideerimine

ISO 17025 standardis on kirjeldatud erinevaid nõudeid laboritele ja sealhulgas on nõutud, et laboritööks kasutataks sobivaid, valideeritud meetodeid. Valideerimine on protsess, mille abil hinnatakse meetodi sobivust vastava analüüdi kvalitatiivseks või kvantitatiivseks määramiseks. Valideerimise käigus määratletakse meetoodika omadused ja piirangud ning selgitatakse välja, millised tegurid võivad neid mõjutada ja mil määral. Analüütilise valideerimise puhul võrreldakse kahte erinevat meetodit, kus tavaliselt uut valideeritavat meetodit võrreldakse varasemalt tõestatud standardmeetodiga (Kalra, 2011).

Iga labor peab valideerima kasutatava alternatiivmeetodi. Juhul kui kasutatakse varem valideeritud meetodit, siis tuleb läbi viia vähemalt osaline valideerimine. Alternatiivmeetodi valideerimisel näidatakse alternatiivmeetodi võimet saada ekvivalentseid või paremaid tulemusi võrreldes referentmeetodiga (Nordval, Veebileht 4). Alternatiivmeetodi valideerimine hõlmab analüüsitulemuste võrdlust referentmeetodi tulemustega, sh laborisiseseid ja laborite vahelisi võrdluskatseid, mis on vajalik uue meetodi usaldusväärsuse hindamiseks ja kinnitamiseks, kasutades selleks tunnustatud valideerimisprotokollis olevaid statistilisi kriteeriumeid (Feldsine *et al.*, 2002). EN ISO 16140:2003 määratleb alternatiivmeetodite valideerimise üldpõhimõtted ja tehnilise protokollid märklaudorganismide tuvastamiseks toidu-, keskkonna- ja söödaproovidest. Valideerimine kehtib vaid katses välja töötatud katsetingimuste ja seadmete puhul (ISO, 2003b). Vastavalt akrediteeritud laborite kvaliteedistandardi ISO 17025 nõuetele teostatakse valideerimine puhaste ja kalibreeritud mõõtevahenditega, tulemused dokumenteeritakse ning säilitatakse. See standard määratleb üldised kompetentsusnõuded katsete, kalibreerimiste ja proovivõttude läbiviimiseks, mille puhul kasutatakse standardseid, mittestandardseid või laboris väljaarendatud meetodeid (ISO/IEC, 2006).

Standardis EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia – alternatiivmeetodite valideerimisprotokoll” on valideeritavale toidukategooriale soovituslikud toidumaatriksid esitatud Lisas B. Alternatiivmeetodi usaldusväärsuse tagamiseks on

soovitatud iga toidukategooria piires kasutada vähemalt 3 erinevat toidumaatriksit ja minimaalselt ühte märklaudorganismi (ISO, 2003b). Ühe toidukategooria piires peab testimata kokku vähemalt 60 proovi ning vastavasse kategooriasse kuuluva maatriksi kohta vähemalt 20 katseproovi. Samuti on vaja iga toidukategooria piires määratleda alternatiivmeetodi tuvastamispiir, mille järgi võiksid 50% proovidest olla positiivsed ja 50% negatiivsed. Nakatamiseks on nõutud vähemalt kolme erinevat inokulumi kontsentratsiooni. Vastava inokulumi kontsentratsiooniga proovid peavad olema vähemalt 6 korduses. Mikroobi kontsentratsioonid, millega toidumaatrikseid või keskkonnaproove nakatatakse peavad nõuete järgi olema suurusjärgudes 0 cfu/ml; 1-10 cfu/ml; 10-100 cfu/ml (ISO, 2003b). Peale nende tingimuste peab võrdlema veel referent- ja alternatiivmeetodil saadud tulemusi, testimata meetodi selektiivsust 30 märklaudtüvega ning spetsiifilisust 30 mitte-märklaudtüvega (ISO, 2003b). Saadud tulemuste põhjal arvutatakse alternatiivmeetodi suhteline täpsus (referent- ja alternatiivmeetodil saadud tulemuste kokkulangevus), suhteline tundlikkus (alternatiivmeetodi võime tuvastada märklaudorganism juhul, kui see tuvastati referentmeetodil), suhteline spetsiifilisus (alternatiivmeetodi võime märklaudorganismi mitte tuvastada juhul, kui referentmeetodiga oli tulemus negatiivne), selektiivsus (näitab alternatiivmeetodi kasutatavust erinevate märklaudorganismi tüvede tuvastamiseks ja teiste mikroobide mittetuvastamiseks) ning suhteline tuvastamispiir (alternatiivmeetodi võime usaldusväärselt tuvastada vähimat märklaudorganismi sisaldust proovis) (Feldsine *et al.*, 2002; ISO, 2003b; NordVal, Veebileht 4). Lisaks kontrollitakse meetodika korduvust ja korratavust. Meetodi korduvus on sama meetodikaga ja katsematerjaliga, samas laboratooriumis, sama töötaja poolt ning sama varustust kasutades lühikeste ajavahemike tagant saadud katsetulemuste kokkulangevus. Meetodi korratavus (laboriväline korratavus) on sama meetodikaga ja katsematerjaliga, aga eri laboratooriumides, erinevate töötajate poolt ning erinevat varustust kasutades saadud katsetulemuste kokkulangevus (Feldsine *et al.*, 2002; ISO, 2003b; NordVal, Veebileht 4).

Avaldatud on mitmeid PCR-meetodil põhinevaid *Salmonella spp.* tuvastussüsteemide tulemusi ja sealhulgas ka rahvusvahelistele valideerimise nõuetele vastavaid meetodikaid. Näiteks Malorny *et al.*, (2003a) arendasid välja ja valideerisid Euroopa Food-PCR projekti raames (5 peamise toidupatogeeni tuvastamiseks mõeldud PCR-meetodite valideerimine ja standardiseerimine) PCR-meetodil põhineva süsteemi tuvastamaks mõlemat *Salmonella*

perekonda kuuluvat liiki. Testiti nelja erinevat praimeripaari, kuid kõige parem tulemus saadi praimeripaariga 139/141 (Malorny *et al.*, 2003a). Rahvusvahelise ühisuuringu käigus, millest võttis osa 16 laborit, valideeriti praimeripaar 139/141 ja kinnitati metoodika analüütiline täpsus vastavalt EN ISO 16140 standardi nõuetele (Malorny *et al.*, 2003a). Seda metoodikat kasutati ka hilisemas ühisuuringus, mis oli üheks osaks samast, Euroopa Food-PCR, projektist. Sellest ühisuuringust võttis osa 4 laborit hindamaks ja kinnitamaks vastava metoodika diagnostilist täpsust naturaalselt ja kunstlikult nakatatud keskkonna-, looma- ja linnulihaproovide puhul (Malorny *et al.*, 2003b). Ühisuuringu käigus näidati, et selle *Salmonella spp.* tuvastamiseks arendatud PCR-meetodi diagnostiline täpsus on 97.5% (Malorny *et al.*, 2003b). Leiti, et antud alternatiivmetoodika on *Salmonella spp.* tuvastamiseks selektiivne ja robustne (Malorny *et al.*, 2003a; Malorny *et al.*, 2003b).

Lisaks on kaubanduslikult saadaval mitmeid erinevaid valideeritud *kit'e Salmonella spp.* kiireks tuvastamiseks (<24 h) PCR-meetodil (DuPont, Veebileht 1; iMicroQ, Veebileht 3; Maurer, 2006). Näiteks on vastavalt EN ISO 16140:2003 standardile valideeritud *QFast® Salmonella Kit* ja *BAX® System PCR Assay for Salmonella*. *QFast® Salmonella Kit* on lihtne, kiire ja usaldusväärne *Salmonella spp.* tuvastussüsteem, mida on valideeritud veterinaar-, keskkonna- ja loomasöödaproovide ulatuses. Meetodile väljastatud rahvusvaheliselt tunnustatud sertifikaadi järgi on *Salmonella* tuvastamiseks mõeldud alternatiivmeetod kasutamiskõlblik ning tagab ISO 6579:2002 standardile vastava referentmeetodiga ekvivalentsed tulemused (iMicroQ, Veebileht 3). *BAX® System PCR Assay for Salmonella* on mitmete riiklike laborite poolt valideeritud ning mitmeid sertifikaate omav (AFNOR, AOAC, NordVal) PCR-meetodil põhinev populaarne *Salmonella spp.* tuvastussüsteem (DuPont, Veebileht 1; Maurer, 2006). Antud meetodit on valideeritud ulatuslikult erinevate toidumaatriksite ja loomasöötade jaoks. Selle PCR-metoodika tuvastamistundlikkus on 10^4 cfu/ml (DuPont, Veebileht 1).

Teaduskirjanduses ja veebis leiduvate andmete põhjal võib järeldada, et PCR-meetod *Salmonella spp.* tuvastamiseks on usaldusväärne ja võiks olla igapäevaselt kasutatav toiduainete ja keskkonnaproovide analüüsimiseks mikrobioloogialaborites.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Kuna senini puudub rahvusvaheliselt standardiseeritud PCR-meetod *Salmonella* tuvastamiseks, siis meetodi akrediteerimiseks on vajalik selle eelnev valideerimine. Käesoleva töö eesmärgiks oli *Salmonella spp.* tuvastamiseks sobiva PCR-meetodi valideerimine ning vastava alternatiivmetoodika täisvalideerimine vastavalt rahvusvahelise standardi EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia - alternatiivsete meetodite valideerimisprotokoll” kohaselt referentmeetodi EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004 „Toidu ja loomasöötade mikrobioloogia horisontaalmeetod *Salmonella spp.* tuvastamiseks” suhtes tuvastamaks *Salmonella spp.* toidu- ja keskkonnaproovidest. Meetodi kasutusala hõlmab mikrobioloogialaborites analüüsitavaid toidu- ja keskkonnaproove.

Salmonella spp. tuvastamiseks kasutatava PCR-meetodi valideerimine hõlmab:

- PCR-meetodi tingimuste optimeerimist;
- toidumaatriksite ja keskkonnaproovide kunstlikku nakatamist *Salmonella spp.* serotüüpidega;
- alternatiivmeetodil ja referentmeetodil saadud tulemuste võrdlevat analüüsi;
- valideeritava metoodika kasutatavuse hindamiseks vajalike parameetrite väärtuste (meetodi selektiivsuse, suhteline spetsiifilisuse, suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse, suhtelise tuvastamispiiri) määramist;

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved

Antud töös kasutatud bakteritüved valiti vastavalt standardi ISO 16140:1999 Lisas G esitatud soovitustele. Märklaud ja mitte-märklaud bakteritüvede valimi suuruse valimisel lähtuti standardis EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia - alternatiivsete meetodite valideerimisprotokoll” esitatud normatiivist, mille kohaselt kasutati meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramiseks 30 märklaud ja 30 mitte-märklaud bakteritüve (Lisa 6).

Märklaudtüvedena kasutati *Salmonella spp* erinevaid serotüüpe, mis hõlmavad ATCC mikroobikollektsiooni referenttüvesid, Icosagen AS Mikrobioloogia laboratooriumis analüüsitud

toiduproovidest isoleeritud tüvesid ja VTL mikroobikollektsiooni tüvesid. VTL kollektsioonist pärinevad *Salmonella* spp. serotüübid on eraldatud toidust või tootmisettevõtete hügieeniproovidest. Katseproovide nakatamiseks kasutati järgnevaid levinud *Salmonella* spp. serotüüpe:

- *Salmonella enterica subspecies enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 (WDMC00031)
- *Salmonella enterica subspecies enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 (WDMC 00030)
- Lisaks ülemaailmselt domineerivatele *Salmonella* serotüüpidele kasutati erinevate kategooriate maatriksite nakatamisel serotüüpe *Salmonella* Agona (VS003), Derby (VS005), Newport (VS013), Heidelberg (VS019) ja Infantis (VS007).

Mitte-märklaudbakteritüved valiti sugukonna *Enterobacteriaceae* hulgast, kuhu kuulub ka perekond *Salmonella*, ja perekondadest, mis võivad esineda nii toidus kui ka toidutootmiskeskkonnas.

Mitte-märklaudbakteritüved pärinevad Icosagen AS mikroobikollektsioonist, hõlmates referenttüvesid ATCC kollektsioonist, ja Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi juures asuvast mittemeditsiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist CELMS- (*Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*) (Lisa 6).

2.2.2 Töös kasutatud toidumaatriksid ja keskkonnaproovid

Antud töös analüüsimiseks kasutatud kategooriad ja vastavad maatriksid valiti lähtuvalt standardi ISO 16140:2003 „Toidu ja loomasöötade mikrobioloogia - alternatiivmeetodite valideerimisprotokoll” Lisas B esitatud nõuete kohaselt. Kasutatud toidumaatriksid valiti Icosagen AS mikrobioloogia laboris analüüsitud toiduproovidest, mida enne uurimistöös kasutamist oli märklaudorganismi suhtes testitud referentmeetodil ning tuvastatud *Salmonella* spp. puudumine. Keskkonnaproovide kunstlikul nakatamisel kasutati steriilseid abrasiivseid käsnu [HS-10NB/2G (3M Microbiology, USA)].

Salmonella spp. tuvastamist analüüsiti viies kategoorias, mis hõlmasid järgmisi toidumaatrikseid ja keskkonnaproove:

1. Kakao- ja šokolaaditooted: Piimašokolaad (Kalev, Eesti); Tumeda šokolaadi mass (Kalev, Eesti); Pralineekompvek (Kalev, Eesti)
2. Maitseained: Tšillipipar (Saue Production, Eesti); Tšillipipar Light (Saue Production, Eesti); Sibulapulber (Saue Production, Eesti)
3. Lihatooted: Toores sealiha (Rannarootsi, Eesti); Ahjuvorstikesed astelpajupüreega (Rannarootsi, Eesti); Lastevorst (Rakvere Lihakombinaat, Eesti)
4. Kanaliha tooted: Grillkana (Rimi, Eesti); Kanasült (Tallegg, Eesti)
5. Keskkonnaproovid: analüüsiks kasutati abrasiivseid käsnu

Uurimistöös kasutatud toidumaatriksid säilitati tulemuste selgumiseni sügavkülmas, temperatuuril -20°C.

2.2.3 Bakterite kasvatamine

Bakteritüvede säilitamiseks ja kasvatamiseks vajalikud söötmed valmistati dehüdreeritud valmissegudest vastavalt tootjafirma juhenditele.

Salmonella spp. tuvastamiseks kasutati järgmiseid selektiivseid ja mitteselektiivseid söötmeid:

- 1) Selektiivne XLD-tardsööde (Conda, Hispaania) *Salmonella spp.* inokulaatide arvukuse määramiseks ja leidumise/mitteleidumise tuvastamiseks temperatuuril 37 °C 18±2 h
- 2) TSA-tardsööde (Conda, Hispaania) *Salmonella spp.* inokulaatide arvukuse määramiseks temperatuuril 37 °C 18±2 h
- 3) Selektiivne tardsööde BGA (Conda, Hispaania) *Salmonella spp.* leidumise/mitteleidumise tuvastamiseks temperatuuril 37 °C 18±2 h
- 4) Mitteselektiivne puljong BPW (Conda, Hispaania) toidumaatriksi eelrikastamiseks temperatuuril 37±1 °C 18±2 h
- 5) Puljong RVS (Labema Eesti OÜ, Eesti) selektiivseks rikastamiseks temperatuuril 41,5±1 °C 24±3 h
- 6) Puljong TSYEB [TSB-sööde (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Suurbritannia) + pärmiekstrakt (Bacto™, Becton Dickinson and Company, USA) + MQ (Quattromed HTI, Eesti)] puhaskultuuride kasvatamiseks üleöö temperatuuril 37 °C

- 7) Puljong MKTTn (Conda, Hispaania) selektiivseks rikastamiseks temperatuuril $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
 $24\pm 3\text{ h}$
- 8) Söötme TSI (Conda, Hispaania) kasutamine *Salmonella spp.* tuvastamise kinnitamisel

2.2.4 Referent- ja alternatiivmeetodi võrdlev katseskeem

Referentmeetodit ja alternatiivset PCR-meetodit võrreldi vastavalt Tabelis 2 esitatud katseskeemile.

Tabel 2. Referent– ja alternatiivmeetodit võrdlev katseskeem

ALTERNATIIVMEETOD EVS-EN ISO 16140:2003 PCR-meetod in-house	REFERENTMEETOD EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004
Eelrikastus Inkubeerimine: temp. $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ $18\pm 2\text{ h}$	
DNA eraldamine 1 ml eelrikastuspuljongist totaalse DNA eraldamine	Selektiivne rikastamine a) 10 ml söödet RVS + 0,1 ml eelrikastuspuljongit Inkubeerimine: temp $41,5\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; $24\pm 3\text{ h}$ b) 10 ml söödet MKTTn + 1,0 ml eelrikastuspuljongit Inkubeerimine: temp. $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; $24\pm 3\text{ h}$
PCR-reaktsioon <i>Salmonella spp.</i> DNA amplifitseerimine a) <i>Salmonella spp.</i> spetsiifilise kahe praimeripaariga IAC kontrolli juuresolekul 1. praimeripaar: ST11/ST15 (juhuslik genoomne fragment) 2. praimeripaar: 139/141 (<i>invA</i>) b) 16S rRNA geenifragmendi amplifitseerimine bakteriaalse DNA eraldamise kontrolliks eubakteritele universaalse praimeripaariga PCRI/PCRII	Väljakülvid a) XLD-tardsöötmele b) BGA-tardsöötmele Inkubeerimine: temp. $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; $24\pm 3\text{ h}$
Märklaudprodukti tuvastamine geelelektroforeesil Vastavalt 1% (a) või 1,5% (b) agarosgeel 1 x TAE puhvis; Visualiseerimine UV valguses ja DNA suurusmarkeri abil produkti suuruse hindamine; a) 16S rRNA geeni produkt on 1500 bp; b) <i>Salmonella spp.</i> spetsiifilise produkti suurus on 429 bp ja 284 bp, IAC-plasmiidi produktide suurus on vastavalt 213 bp ja 457 bp; Test loetakse <i>Salmonella spp.</i> tuvastamise suhtes positiivseks, kui tuvastatakse <i>Salmonella spp.</i> DNA ja 16S rRNA geeni amplifitseerimise produktid. Testi tulemus on negatiivne juhul kui <i>Salmonella spp.</i> DNA puudub, kuid IAC-plasmiidi produkt on olemas. IAC-plasmiidi produkti puudumisel loetakse test tehniliselt ebaõnnestunuks (valenegatiivne).	
Tulemuste kinnitamine <i>Salmonella spp.</i> spetsiifilise produkti tuvastamisel	Tulemuste kinnitamine Valida kuni 5 tüüpilist kolooniat mõlemalt söötmelt

teostatakse eelrikastuspuljongist külvid vastavalt referentmeetodile EVS-EN ISO 6579:2003. Valida kuni 5 tüüpilist kolooniat kinnitavateks testideks:	kinnitavateks testideks
a) biokeemilised testid	a) biokeemilised testid
b) seroloogiline test vastavalt labori akrediteerimisulatusale.	b) seroloogiline test
	<i>Salmonella spp.</i> kinnitavad testid on ära toodud peatükis 2.2.5

2.2.5 *Salmonella spp.* tuvastamist kinnitavad testid vastavalt referentmeetodi standardile EVS-EN ISO 6579:2003

Eeldatava *Salmonella spp.* kinnitavate testide läbiviimiseks valiti XLD või BGA selektiivsöötmetel kasvanud 1-5 tüüpilist kolooniat ja eraldati puhaskultuuri. Puhaskultuuriga viidi Icosagen AS laborantide poolt läbi biokeemilised ja seroloogilised testid *Salmonella spp.* esinemise/puudumise kinnitamiseks proovis. Seroloogilistest testidest tuvastati *O* antigeeni olemasolu kommertsiaalse antiseerumiga *Poly A-S+Vi* (Statens Serum Instiut).

Salmonella spp. tuvastamist kinnitavad biokeemilised testid olid järgmised:

- glükoosi kääritamise test TSI-söötmetel (*Salmonella spp.* on iseloomulik glükoosi kääritamine happe tekkega)
- laktoosi kääritamise test TSI-söötmetel (enamasti laktoosi mitteääritavad)
- sahharoosi kääritamise test TSI-söötmetel (enamasti sahharoosi mitteääritavad)
- gaasi eraldumise test TSI-söötmetel (*Salmonella spp.* on iseloomulik gaasi eraldumine)
- H₂S produktsiooni test TSI-söötmetel (*Salmonella spp.* on iseloomulik H₂S produktsioon)
- lüsiini dekarboksülaasi test (positiivne)
- ureaasi test (negatiivne)
- β-galaktosidaasi-test (negatiivne)
- indooli test (negatiivne)
- Voges Proskaueri (V-P) test (negatiivne)

2.2.6 Toidumaatriksite ja keskkonnaproovide kunstlik nakatamine

2.2.6.1 Bakterikultuuri kasvatamine ja nakatamiseks kasutatava inokulaadi valmistamine

Nakatamiseks kasutatavat *Salmonella spp.* bakterikultuur kasvatati 5 ml TSYEB-puljongis üleöö temperatuuril 37 °C. Üleöö kasvanud bakterisuspensioonist valmistati kümnendlahjenduste rida ning arvukuse määramiseks tehti lahjendustest 10⁻⁶-10⁻⁷ väljakülvid XLD-tardsöötmele.

Väljakülv teostati pindkülv meetodil külvimääraga 100 µl. Stressi imiteerimiseks hoiti nakatamiseks kasutatavaid bakterisuspensioone üleöö (kuni arvukuse selgumiseni) temperatuuril 6 ± 2 °C. Lähtuvalt loendamistulemustest valmistati üleöö seisnud bakterikultuurist uued vajaliku arvukusega inokulaadid toidu- ja keskkonnaproovide nakatamiseks.

Nakatamiseks kasutatud inokulaatidest tehti arvukuse kontrollimiseks väljakülvid XLD tardsöötmele, mida inkubeeriti temperatuuril 37 °C 18 ± 2 h. Nakatamise edukust kontrolliti pärast eelrikastamist väljakülvidega XLD söötmele (inkubeeriti 37 °C 18 ± 2 h).

Alternatiivmeetodi selektiivsuse määramiseks kasvatati *Salmonella spp.* märklaudtüvesid sarnastel tingimustel. Mesofiilseid mitte-märklaudtüvesid kasvatati sarnaselt eelpool kirjeldatule, kuid kasvatustemperatuuriks valiti 30 °C. Inokuleerimiseks kasutati minimaalsest tuvastamispiirist 10 kuni 100 korda kõrgemat arvukust.

2.2.6.2 Katseproovide kunstliku nakatamise ja rikastamise toimingud

Kirjeldatud skeemi rakendati kõikide toidumaatriksite ja keskkonnaproovide puhul sarnaselt 6-7 korduses ühe maatriksi ulatuses.

Katseproovi ja inokulaadi ettevalmistamine eelrikastamiseks. Eelrikastusetapp toimub sarnaselt referentmeetodile ja viidi läbi järgmiselt:

1. *Salmonella spp.* inokulaadi ettevalmistus väljakülvi loendamistulemuste põhjal;
2. Katseproovi kaalumise Stomacheri kilekotti – 25 grammi (1 osa) toidumaatriksit, keskkonnaproovide puhul abrasiivse käsna kaalumise;
3. Katseproovile puhverdatud peptonvee (BPW) lisamine:

1 osale katseproovile (g) lisati 9 osa (g) puhverdatud peptonvett. Lähtuvalt standardis EVS-EN ISO 6579:2003/cor.1:2004 kehtestatud normatiividele lisatakse kakao- ja šokolaaditoodete puhul puhverdatud peptonvett lõssilisandiga lõppkontsentratsioonil 10%, maitseainete puhul peptonvett K₂SO₃ lisandiga lõppkontsentratsioonil 0,5%. Antud lisandid aitavad vähendada vastavate kategooriate maatriksitest tulenevate *Salmonella spp.* kasvu inhibeerivate negatiivsete tegurite (näiteks taustmikrofloora elutegevus, erinevad soolad, vürtsid, rasvad) mõju, soodustades *Salmonella spp.* elutegevust ja eeskätt vigastatud rakkude turgutust);

4. Inokulaadi lisamine (välja arvatud nakatamata kontrollproovide korral) - 1 ml erineva arvukusega inokulaadi pipeteerimine Stomacheri kotti;

5. Katseproovide segamine Stomacheri homogenisaatoris 30 sekundit;
6. Katseproovide inkubeerimine temperatuuril 37°C 18 ± 2 h.

Alternatiivmeetodi puhul säilitati eelrikastuspuljongit temperatuuril $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ kuni PCR-reaktsiooni tulemuste tuvastamiseni ja hindamiseni. Referentmeetodi puhul viidi läbi selektiivrikastusetapp:

- 1) 10 ml RVS puljongisse lisati 0,1 ml eelrikastuspuljongit ja katseproovi inkubeeriti temperatuuril $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$; 24 ± 3 h.
- 2) 10 ml MKTTn söötmesse lisati 1,0 ml eelrikastuspuljongit ja katseproovi inkubeeriti temperatuuril $37,0\pm 1^{\circ}\text{C}$; 24 ± 3 h.

2.2.6.3 *Salmonella* spp. tuvastamine kakao- ja šokolaaditoodetest

Kakao- ja šokolaaditoodete kategoorias analüüsiti paralleelselt alternatiiv- ja referentmeetodil kokku 98 katseproovi, mis hõlmasid 40 negatiivset proovi (sealhulgas 18 kunstlikult nakatamata kontrollproovi, 20 naturaalselt negatiivset katseproovi ja 2 võrdluskatseproovi) ning 58 kunstlikult nakatatud katseproovi. Maatriksite pralineekompvekkide, tumeda šokolaadi ja piimašokolaadi Panda Maito nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe kas Typhimurium ja/või Enteritidis. Naturaalsed proovid saadi Icosagen AS Mikrobioloogia laborisse analüüsimiseks saadetud toiduproovide hulgast, mille analüüsimine toimus sarnaselt kunstliku nakatamise toimingutele (peatükk 2.2.6.2), kuid inokulaati lisamata. Kõiki naturaalseid toidumaatrikseid valmistati ette ja analüüsiti 2 korduses Icosagen AS Mikrobioloogia laborantide poolt.

Maatrikseid nakatati ühes seerias kuues korduses, kasutades *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri lähedase (TP, 1–4 cfu/25g), madala (MA, 2–10 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 10–1000 cfu/25 g) inokulaate. Antud kategoorias *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri määramiseks nakatati piimašokolaadi Panda Maito't serotüübiga *Salmonella* Typhimurium tuvastamiskiirile lähedaste arvukustega (TP S2, 1-2 cfu/ml; TP S4, 2-4 cfu/ml) (Lisa 4).

2.2.6.4 *Salmonella* spp. tuvastamine maitseainetest

Maitseainete kategoorias analüüsiti paralleelselt alternatiiv- ja referentmeetodil kokku 72 katseproovi, mis hõlmasid 20 nakatamata ja 52 kunstlikult nakatatud katseproovi. Maatriksite tšillipipra, tšillipipar Light'i ja sibulapulbri nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Agona ja/või Derby.

Maatrikseid nakatati ühes seerias kuues korduses, kasutades *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri lähedase (TP, 1–2 cfu/25 g), madala (MA, 2–10 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 10–100 ja 100–1000 cfu/25 g) inokulaate. Antud kategoorias *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri määramiseks nakatati tšillipipart serotüübiga *Salmonella* Agona tuvastamiskiirile lähedase arvukusega (TP, 1-2 cfu/25 g) (Lisa 4).

2.2.6.5 *Salmonella* spp. tuvastamine lihatoodetest

Lihatoodete kategoorias analüüsiti paralleelselt alternatiiv- ja referentmeetodil kokku 72 katseproovi, mis hõlmasid 18 nakatamata ja 54 kunstlikult nakatatud katseproovi. Maatriksite sealiha, ahjuvorstikesed astelpajupüreega ja lastevorsti nakatamiseks kasutati vastavalt *Salmonella* serotüüpe Enteritidis, Derby ja Newport.

Maatrikseid nakatati ühes seerias kuues korduses, kasutades *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri lähedase (MP, 1–2 cfu/25 g), madala (MA, 2–10 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 10–100 cfu/25 g) inokulaate (Lisa 4).

2.2.6.6 *Salmonella* spp. tuvastamine kanalihast

Kanaliha kategoorias analüüsiti paralleelselt alternatiiv- ja referentmeetodil kokku 84 katseproovi, mis hõlmasid 18 nakatamata ja 66 kunstlikult nakatatud katseproovi. Maatriksite grillkana ja kanalihasüldi nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Heidelberg ja/või Enteritidis.

Maatrikseid nakatati ühes seerias kuues korduses, kasutades *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri lähedase (TP, 1-2 cfu/25 g), madala (MA, 10-20 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 100-1000 ja 20-100 cfu/25 g) inokulaate. Tuvastamiskiiri määramiseks nakatati grillkana serotüübiga *Salmonella* Heidelberg tuvastamiskiirile lähedase arvukusega (TP, 1-2 cfu/25 g) (Lisa 4).

2.2.6.7 *Salmonella* spp. tuvastamine keskkonnaproovidest

Keskkonnaproovide kategoorias analüüsiti paralleelselt alternatiiv- ja referentmeetodil kokku 84 katseproovi, mis hõlmasid 18 nakatamata ja 66 kunstlikult nakatatud katseproovi. Abrasiivsete käsnade (3M Microbiology, USA) nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Enteritidis, Infantis ja Typhimurium.

Abrasiivseid käsnu nakatati ühes seerias kuues korduses, kasutades *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri lähedase (TP, 1–2 cfu/11 g), madala (MA, 10–20 ja 2–6 cfu/11 g) ja kõrge arvukusega (KA, 20–100 ja 100–1000 cfu/11 g) inokulaate. Antud kategoorias *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri määramiseks nakatati abrasiivseid käsnu serotüübiga *Salmonella* Infantis tuvastamiskiirile lähedase arvukusega (TP, 1–2 cfu/11 g) (Lisa 4).

2.2.7 Bakteriaalse DNA eraldamine

Bakteriaalne DNA eraldati 1 ml eelrikastuse puljongist komplektiga *RTP Bacteria® DNA Mini Kit* (STRATEC Molecular GmbH, Saksamaa) vastavalt tootja poolt koostatud protokollile.

DNA eraldamise komplekt sobib bakteriaalse, sealhulgas *Salmonella* spp. DNA eraldamiseks toidust ning keskkonnaproovidest, milles esineb kuni 10^9 cfu/ml mikroobi. DNA eraldamise käigus kasutati tsentrifuugi *Eppendorf Centrifuge 5424* ning termomiksereid *Eppendorf ThermoStat plus* ja *Eppendorf Thermomixer compact*.

2.2.8 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

2.2.8.1 Töös kasutatud praimerid

Antud töös kasutati kahte *Salmonella* spp. spetsiifilist praimeripaari (ST11/ST15 ja 139/141) ning ühte praimeripaari kinnitamaks PCR-reaktsiooniks sobiva bakteriaalse DNA esinemist eraldatud proovis (PCR1/PCR2) (Tabel 3).

Tabel 3. Töös kasutatud praimerite seondumistemperatuur, sihtmärkgeen, amplifitseeritava produkti suurus

Sihtmärkgeen	Nim.	5'→3' järjestus	Tm°C	Produkti suurus	Viide
Juhuslik genoomne fragment	ST11	5'-AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA-3'	70	429 bp	Aabo <i>et al.</i> , 1993
	ST15	5'-GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG-3'	66		
<i>invA</i>	139	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA-3'	70	284 bp	Rahn <i>et al.</i> , 1992
	141	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	67		
16S rRNA	PCR I	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	59	1500 bp	Weisburg <i>et al.</i> , 1990
	PCR II	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'	60		

2.2.8.2 Töös kasutatud arvutiprogrammid ja veebilehed praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 analüüsiks ja iseloomustamiseks

Praimerite võrdluseks kasutati *Nucleotide blast* tarkvara

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

Praimerite iseloomustamiseks kasutati bioinformaatilist programmi:

http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html ning vastavat vabavaralist Clone Manager 5 rakendust.

2.2.8.3 PCR-metoodika valideerimisel kasutatud plasmiidid

Antud PCR-metoodikas kasutati konkureerivat sisemist amplifikatsiooni kontrolli (*internal amplification control* – IAC). Konkureerival IAC-l on märklaud-DNA järjestusega samad praimerite seondumiskohad, kuid amplifitseeritava produkti pikkus on testitavalt DNA-lt amplifitseeritava produkti omast erinev. IAC lisatakse igasse katseproovi, va. negatiivsete kontrollproovide PCR reaktsioonisegusse.

Sisemiste amplifikatsiooni kontrollide valmistamiseks kasutati *Salmonella spp.* genoomist vastavalt praimeripaaridega ST11/ST15 ning 139/141 amplifitseeritud DNA fragmente. Mõlemad

PCR-produktid sisestati vektorisse pGEM-T-easy ning saadi plasmiidid pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 ja pGEM-T-Easy-ST139/141 #12. ST11/ST15 praimeritega amplifitseeritud fragmendist deleteeriti 216 aluspaari. 139/141 praimeritega amplifitseeritud 284 bp pikkusele fragmendile sisestati 173 aluspaari pikkune DNA lõik vektorist pBluescript, mis ei oma sarnasust kasutatavate PCR praimeritega. Deletsiooni ja insertsiooni tegemiseks kasutati restriksioon/ligatsioon metoodikat. Saadud plasmiidid pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 ning pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 eraldati *E. coli* DH5α tüvest, kasutades selleks Maxi EF kitti (Qiagen). Plasmiidilt pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 amplifitseeritava produkti suuruseks on 213 bp ning plasmiidilt pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 457 bp.

DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriselt, kasutades NanoDrop 2000c aparatuuri ning vastavat DNA kontsentratsiooni määramise tarkvara (NanoDrop 2000/2000c). Eraldatud DNA-d vastavalt kontsentratsioonile kasutati DNA molekulide arvu määramiseks ning tööks vajalike DNA lahjenduste tegemiseks. Plasmiidid konstrueeris Icosagen AS labori töötaja Gaily Kivi.

2.2.8.4 PCR-meetodis kasutatud negatiivsed kontroll ja positiivsed kontrollid

Negatiivse kontrollina kasutatakse PCR reaktsioonisegu, milles märklaua-DNA on asendatud veega. *Salmonella* spetsiifiliste praimeritega läbiviidud PCR katsetes kasutati positiivse kontrollina puhaskultuurist eraldatud *Salmonella* Agona (VS003) või *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) genoomset DNA-d. DNA eraldati komplektiga *RTP Bacteria® DNA Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH)*, järgides vastavat tootjapoolset protokoll. 16S rRNA geenifragmendi amplifitseerimiseks kasutati meetodi arendamise algfaasis positiivse kontrollina bakteri *Bacillus subtilis* (ATCC 1774) genoomset DNA-d, mis eraldati sarnaselt *Salmonella spp.* puhaskultuuridele.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide ning analüüsitava katseproovide DNA maht (10 µl), mida PCR-reaktsioonis kasutati, oli eelnevalt meetodi arendamise algfaasis optimeeritud Icosagen AS labori poolt.

2.2.8.5 PCR-meetodi valideerimisel kasutatud reaktiivid

PCR-meetodi optimeerimise etappides kasutatud reaktiivid:

- *Salmonella spp.* DNA amplifitseerimiseks kasutatud praimeripaarid ST11/ST15 ja

139/141 (Microsynth AG, Šveits) (Tabel 3)

- Bakteriaalse DNA kontrollimiseks kasutatud praimeripaar PCRI/PCRII (Microsynth AG, Šveits) (Tabel 3)
- PCR valmissegud (Solis BioDyne, Eesti) (Lisa 2):
 - *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 7.5 mM MgCl₂*;
 - *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 10 mM MgCl₂*;
- MQ vesi (Quattromed)
- Brauni vesi - steriilne, endotoksiinivaba vesi (B. Braun Melsugen AG, Saksamaa)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas, Leedu)
- IAC-plasmiidi pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ ja Brauni vees (Icosagen)
- IAC-plasmiidi pGEM-T-Easy-139/141-ins #1 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ ja Brauni vees (Icosagen)
- Kontrollplasmiidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ ja Brauni vees (Icosagen)
- Kontrollplasmiidi pGEM-T-Easy-139/141 #12 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ ja Brauni vees (Icosagen)
- *S. Typhimurium* (ATCC 14028) genoomne DNA (positiivne kontroll)
- *S. Agona* (VS003) genoomne DNA (positiivne kontroll)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 1774) genoomne DNA (16S rRNA PCR-analüüsi positiivne kontroll)

2.2.8.6 PCR optimeerimine

2.2.8.6.1 Kasutatud PCR'i programmid

Alternatiivmeetodi optimeerimise algusfaasis kasutati Icosagen AS labori poolt kujundatud PCR programme „Salmastm” ja „Salm”, mida kasutati erinevate PCR parameetrite optimeerimisel. Antud PCR'i programmide etapid ja tingimused on näidatud Lisas 5. Kõik PCR-reaktsioonid viidi läbi Biometra T-Personal termotsükleriga (aparatuuri temperatuuri tõstmise ja langetamise kiiruseks on 3 °C sekundis).

Praimerite paaride ST11/ST15 ja 139/141 seondumistemperatuurid olid PCR metoodika arendamise algusfaasis Icosagen AS labori poolt optimeeritud. Lähtuvalt algusfaasis tehtud katsete tulemustest leiti, et praimerite seondumistemperatuuri muutmine vahemikus 60-70 °C ei avaldanud olulist mõju PCR'i spetsiifilisusele ja otsustati võtta edaspidiste katsete jaoks kasutusele testitud gradiendi keskmine väärtus 65 °C.

2.2.8.6.2 PCR-reaktsioonis kasutatava optimaalse reaktsioonisegu valimine

Icosagen AS labori poolt viidi metoodika arendamise algfaasis ST11/ST15 praimeritega läbi eksperiment sobiva PCR reaktsioonisegu leidmiseks. Testiti nelja erinevat kommertsiaalselt PCR'i valmisseguga (Solis BioDyne, Eesti) (Lisa 1), mis kõik andsid spetsiifilise PCR-reaktsiooni. *5x Solis Hot FIREPol Blend PCR Master Mix* ja *5x Solis FIREPol 5x Master Mix* andsid madalamatel kontroll DNA kontsentratsioonidel intensiivsemad PCR-produktid. Omavahelise võrdluse tulemusena otsustati edaspidi katseid läbi viia *5x Solis Hot FIREPol Blend PCR Master Mix*-ga, kuna antud valmisseguga olid PCR-i produktid konkreetsemad.

2013 aasta sügisest on kasutusel oleva valmis reaktsioonisegu tähiseks *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 10 mM MgCl₂* (Lisa 2).

2.2.8.7 Bakteriaalse DNA eraldamise kontroll

Enne praimeripaaridega ST11/ST15 ja 139/141 läbiviidavat PCR-analüüsi *Salmonella spp.* tuvastamiseks kontrolliti bakteriaalse DNA eraldumise õnnestumist ning eraldatud DNA sobilikkust PCR-reaktsiooniks. Selleks amplifitseeritakse spetsiifiliste praimeritega PCRI/PCRII eubakterite 16S rRNA geeni (primerite järjestused ja PCR-produkti suurus on näidatud Tabelis 3). Kakao- ja šokolaaditoodete kategooria ja valideeritava PCR-meetodi selektiivsuse katsetes kasutati bakteriaalse DNA eraldamise kontrollimiseks Icosagen AS kasutusel olnud vastavat programmi „16S rRNA vana”, mis on näidatud Lisas 5. Maitseainete, lihatoodete, kanalihatoodete ja keskkonnaproovide kategooriate puhul kasutati bakteriaalse DNA kontrollimiseks Icosagen AS poolt ümberkujundatud programmi „16S rRNA” (Lisa 5). Bakteriaalse 16S rRNA geeni amplifitseerimiseks kasutatav PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl sisaldas *5x Solis HOT FIREPol® Blend PCR Master Mix +7.5 mM MgCl₂ Ready to Load (-with) with BSA*, 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, 10 µM praimerid PCRI ja PCRII lõppkontsentratsiooniga 0,4 µM. Reaktsioonisegusse lisatav DNA maht (1 µl), oli optimeeritud Icosagen AS labori poolt.

2.2.8.8 PCR-produktide visualiseerimine ja kontrollimine

Saadud PCR-produktid kontrolliti geelelektroforeesiga 1,5%-lisel agarosgeelis TAE puhvris (40 mM Tris; 20 mM atsetaat; 0,5 M EDTA, pH 8,0). Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0,35 µg/ml. Geelile kanti 10 µl analüüsitavat proovi ja produktide suuruse võrdlemiseks 3,5 µl suurusmarkereid GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder #SM0241 (Fermentas, Leedu) või GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder #SM0312 (Fermentas, Leedu). Elektroforees viidi läbi foreesiaparaadiga Biometra Standard Power Pack P25, voolupingel 9 V/cm. DNA fragmendid visualiseeriti ultravioletvalguses eksponeerides geeli UV kiirgusele. Geeli dokumenteerimise süsteemina kasutati Uvitec Cambridge DBT–2000.

2.2.9 Alternatiiv- ja referentmeetodi tulemuste võrdleval analüüsil määratavad parameetrid

Alternatiivmeetodi (PCR-meetodi) iseloomustamiseks määrati järgnevad parameetrid:

Suhteline täpsus [*relative accuracy* - AC] on referent- ja alternatiivmeetodil saadud tulemuste kokkulangevus. Suhtelise täpsuse arvutamiseks kasutatakse positiivsete (PA) ja negatiivsete tulemuste kokkulangevust (NA) ning katseproovide arvu (N): $AC = 100 \times (PA + NA)/N$

Suhteline tundlikkus [*relative sensitivity* - SE] iseloomustab alternatiivmeetodi võimet tuvastada testitavat märklaudmikroobi kui see tuvastati ka referentmeetodil. Suhtelise tundlikkuse arvutamiseks kasutatakse positiivsete tulemuste kokkulangevust ja meetodite negatiivse hälbe (ND) summat: $SE = 100 \times (PA + ND)$

Suhteline spetsiifilisus [*relative specificity* - SP] on alternatiivmeetodi võime testitavat märklaudmikroobi mitte tuvastada, kui seda ei tuvastatud ka referentmeetodil. Suhtelise spetsiifilisuse arvutamiseks kasutatakse negatiivsete tulemuste kokkulangevust ja positiivse hälbe summat (PD) $SP = 100 \times (NA + PD)$

Positiivne hälve [*positive deviation* - PD] näitab, et alternatiivse meetodiga saadud positiivne tulemus on valepositiivne tulemus, kui standardmeetodil saadi negatiivne tulemus.

Negatiivne hälve [*negative deviation* - ND] saadakse kui referentmeetod annab positiivse, kuid alternatiivmeetod negatiivse tulemuse.

Tuvastamispiiriks nimetatakse vähimat analüüdi sisaldust proovis, mida on valitud metoodikaga võimalik usaldusväärselt tuvastada.

Selektiivsuseks nimetatakse meetodi võimet mõõta vaid analüüdi sisaldust ning seejuures mitte olla mõjutatud teiste ainete sisaldumisest proovis. Spetsiifilisus on 100% selektiivsus. Selektiivsuse määramine näitab alternatiivmeetodi kasutatavust.

Inklusiivsus on alternatiivmeetodi võime tuvastada märklaudorganismi erinevad tüved.

Eksklusiivsus näitab alternatiivmeetodi võimet välistada mitte-märklaud tüvede tuvastamist ning seda, et toidus esinevad mitte-märklaudbakterid ei anna valideeritava meetodiga positiivset tulemust.

2.3 Tulemused

2.3.1 *Salmonella* spp. tuvastamiseks kasutatavate praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 bioinformaatiline analüüs

Kasutades molekulaarbioloogia valdkonnas rakendatavat tarkvara Clone Manager 5 ja bioinformaatilist programmi: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html, analüüsiti praimeripaare ST11/ST15 ja 139/141. Kahe analüüsiprogrammi tulemused korreleerusid hästi. Kasutatavate praimerite spetsiifilisust analüüsiti, kasutades algoritmi *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome), mille abil võrreldi antud praimerite nukleotiidseid järjestusi erinevate organismide nukleotiidses järjestustes. Saadi järgmised tulemused:

- **ST11** praimer analüüs näitas järjestuse identsust *Salmonella* spp. DNA järjestustega. Võrdlus erinevate eu- ja prokarüootidega näitas osalist DNA järjestuse sarnasust. 72% sarnasus leiti *Medicago truncatula* viienda kromosoomi järjestusega (kattumine 17 nukleotiidi ulatuses praimer keskosa), kuid praimer 5' otsast jääb 2 nukleotiidi paardumata ja 3' otsast viis nukleotiidi paardumata. Kõikide ülejäänud organismide võrdluste puhul on võimalus praimer spetsiifiliseks seondumiseks väiksem.
- **ST15** praimer analüüs näitas järjestuse identsust *Salmonella* spp. DNA järjestustega. Võrdlusel tuvastati erinevate eu- ja prokarüootidega osalist DNA järjestuse sarnasust. Suurim sarnasus esineb *Stanieria cyanosphaera* kromosoomiga 17 nukleotiidi ulatuses, kuid praimer 3' otsast jääb seitse nukleotiidi paardumata. Kõikide ülejäänud organismide võrdluste puhul on võimalus praimer spetsiifiliseks seondumiseks väiksem.
- **139** praimer analüüs näitas järjestuse identsust *Salmonella* spp. DNA järjestustega. Võrdlusel tuvastati erinevate eu- ja prokarüootidega osalist järjestuse sarnasust. Suurim sarnasus esineb *Brucella suis* esimese kromosoomi järjestusega. Praimeri 5' otsast jääb paardumata kaks- ning praimer 3' otsast 6 nukleotiidi. Kõikide ülejäänud organismide võrdluste puhul on võimalus praimer spetsiifiliseks seondumiseks väiksem.
- **141** praimer analüüs näitas järjestuse identsust *Salmonella* spp. DNA järjestustega. Võrdlusel tuvastati erinevate eu- ja prokarüootidega osalist järjestuse sarnasust. Suurim

nukleotiidne sarnasus on *E. coli* tüvede Xuzhou21, O55:H7 str. RM12579 ning O7:K1 str. CE10 genoomi järjestusega. Kõikidel juhtudel jääb paardumata üks nukleotiid praimeril 11. positsioonis. Kõikide ülejäänud organismide võrdluste puhul on võimalus praimeril spetsiifiliseks seondumiseks veel väiksem.

Praimerite ST11 ja ST15 spetsiifilisus on *Salmonella spp.* järjestuste võrdluse järgi kõrge, teadaolevate mitte-märklau organismide genoomidelt spetsiifilise PCR-produkti saamise tõenäosus aga väga väike. Analüüsiga näidati, et suurimat praimerite kattuvust näidanud mitte-märklau organismidel jäävad praimerite ST11, ST15 ja 139 puhul praimeril 3' otsast nukleotiidid paardumata. Kuna DNA sünteesi algatamiseks on vajalik praimeril 3' otsa komplementaarsus, siis nende mitte-märklau organismide genoomide puhul antud praimeritega DNA sünteesi ei algatata. Praimeril 139 spetsiifilisus on *Salmonella spp.* järjestuste võrdluse järgi kõrge, praimer 141 võib, aga spetsiifiliselt seonduda kolme *E. coli* tüve DNA järjestusega. Praimeril 139 ei esine komplementaarsust *E. coli* tüvedega, mistõttu nende praimerite kasutamine PCR-reaktsioonil peaks tagama *Salmonella spp.* spetsiifilise määramise.

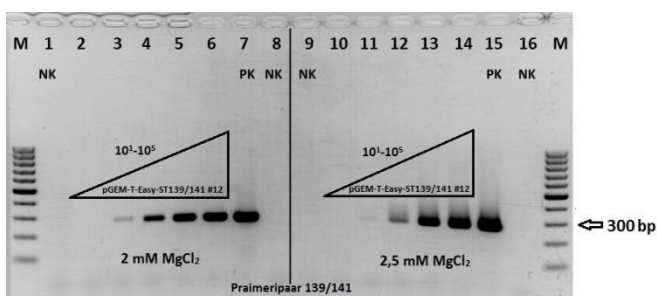
2.3.2 PCR-meetodi optimeerimine

2.3.2.1 PCR-reaktsiooniks sobivaima MgCl₂ kontsentratsiooni määramine

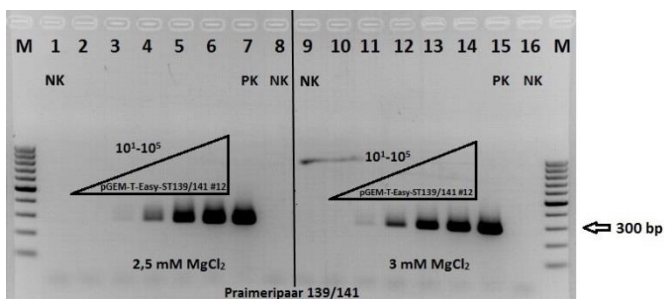
Kirjanduses on näidatud, et MgCl₂ sisalduse suurendamine PCR'i reaktsioonisegus tõstab DNA-polümeraasi aktiivsust ja indutseerib mittespetsiifilise reaktsiooni teket ning vastupidi (Zangenberg *et al.*, 1999). Sellepärast on oluline leida PCR'i reaktsioonisegus MgCl₂ kontsentratsioon, mis tagaks nii optimaalse DNA-polümeraasi töö kui ka võimaldaks saada diskreetseid PCR-produkte.

Sobiva MgCl₂ kontsentratsiooni valimiseks kasutati katses MgCl₂ lõppkontsentratsiooniga 2 mM, 2,5 mM või 3 mM koos PCR valmisseguga *5x Solis Hot FIREPol Blend PCR Master Mix* (Solis BioDyne, Eesti) ja praimeripaariga ST11/ST15 või 139/141. DNA matriitsina kasutati praimeripaarile vastavat positiivset kontrollplasmidi lahjendustega 10¹ kuni 10⁵ molekuli reaktsiooni kohta. Täiendava positiivse kontrollina kasutati *S. Typhimurium* genoomset DNA-d ja negatiivse kontrollina MQ. Katses kasutati meetodika algfaasis Icosagen AS poolt kujundatud astmelist PCR-programmi „Salmastm” (Lisa 5).

Katse tulemustest on näha, et 2,5 mM ja 3,0 mM MgCl_2 kontsentratsioon kasutamisel reaktsioonisegus saadi hajusamad PCR-produktid, mis võib viidata mittespetsiifilise reaktsiooni tekkele (joonised 1 ja 2). 2 mM MgCl_2 kontsentratsiooni kasutamisel reaktsioonisegus olid PCR-produktid diskreetsemad ning spetsiifiline reaktsioon oli detekteeritav ka kontrollplasmidi madalamast lahjendusest (joonised 1 ja 2). Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati *Salmonella spp.* tuvastamiseks kasutada PCR reaktsioonisegus MgCl_2 lõppkontsentratsiooniga 2 mM.



Joonis 1. PCR reaktsioonisegu MgCl_2 kontsentratsiooni optimeerimine, kasutades praimeripaari 139/141 ja MgCl_2 lõppkontsentratsiooniga 2 mM (rajad nr 1-8) ja 2,5 mM (rajad nr 9-16) [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 8, 9, 16 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6, 10-14: kontrollplasmid pGEM-T-Easy-ST139/141 #12 (284bp) 10^1 - 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 7, 15: PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium*].



Joonis 2. PCR reaktsioonisegu MgCl_2 kontsentratsiooni optimeerimine, kasutades praimeripaari 139/141 ja MgCl_2 lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM (rajad nr 1-8) ja 3 mM (rajad nr 9-16) [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 8, 9, 16 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6, 10-14: kontrollplasmid pGEM-T-Easy-ST139/141 #12 (284bp) 10^1 - 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 7, 15: PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium*].

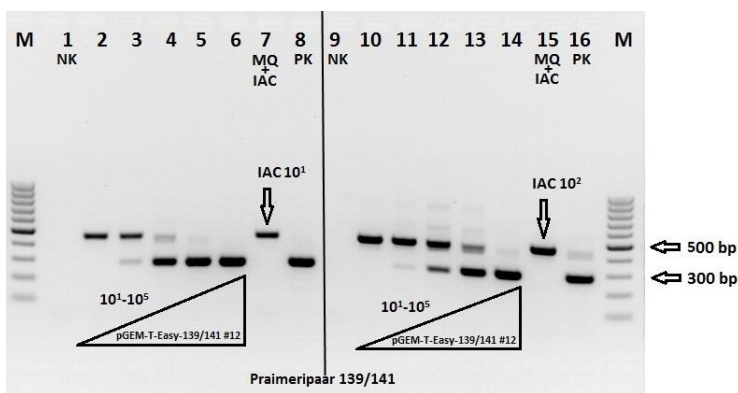
2.3.2.2 Positiivse kontrollplasmidi ja IAC-plasmidi molekulide arvu optimeerimine PCR-reaktsiooniks

PCR-meetodi usaldusväärsuse tagamiseks on oluline kasutada nii positiivset kontrolli kui ka sisemist amplifikatsiooni kontrolli (IAC), mis aitavad tuvastada PCR'i reaktsiooni võimalikku inhibitsiooni, vältida valenegatiivsete tulemuste kinnitamist ning seeläbi tõsta ka negatiivsete analüüsitulemuste usaldusväärsust (ISO, 2005; Hoorfaretal., 2004; Sachadyn ja Kur, 1998).

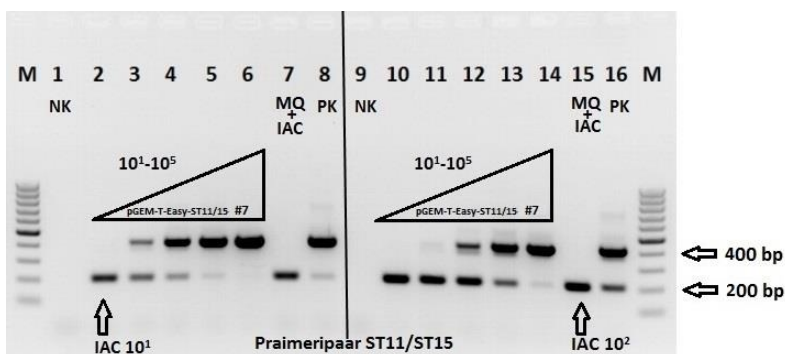
Optimeerimise eesmärgiks oli saavutada tingimused, mille kohaselt IAC-plasmidi kogus PCR-reaktsioonis annaks tuvastatava produkti, kuid IAC-produkti moodustumine ei inhibeeriks (konkureeriks) kontrollplasmidi või kasteproovi sihtmärkgeeni amplifitseerimist (IAC-plasmidi kaasamine ei tohi vähendada testitava proovi signaali katseproovist). IAC-plasmide testiti lahjendustel 10^1 , 10^2 , 10^3 IAC-molekuli PCR-reaktsiooni kohta. Testitava proovi mimikeerimiseks lisati reaktsioonisegusse amplifitseeritavat fragmenti sisaldavat plasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 (praimeripaar ST11/ST15) või pGEM-T-Easy-ST139/141 #12 (praimeripaar 139/141) 10^1 kuni 10^5 molekuli reaktsiooni kohta.

PCR reaktsioonisegu (lõppmaht 25 μ l) sisaldas *5x Solis HOT FIREPol® Blend PCR Master Mix + 10 mM MgCl₂ Ready to Load (-)*, 2 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, primereid lõppkontsentratsiooniga 0,4 μ M. PCR'i läbiviimiseks kasutati programmi „SalmUUS” (peatükk 2.3.2.4).

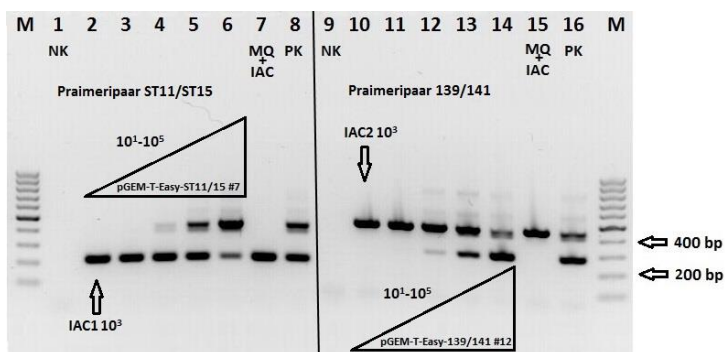
Katse tulemustest selgus, et IAC-plasmidi 10^1 molekuli reaktsiooni kohta, andis liiga nõrga IAC-PCR-produkti (joonised 3 ja 4) ja IAC-plasmidi 10^3 molekuli reaktsiooni kohta muutis IAC-produkti domineerivaks ning nõrgendas oluliselt positiivse kontrollplasmidi PCR-produkti intensiivsust (joonis 5). Kontrollplasmidide kümnendlahjenduste reas andis 10^2 molekuli reaktsioonisegus nõrga PCR-produkti (joonised 3 ja 4). Samas ei olnud selline PCR-produkt piisavalt robustne ja usaldusväärne. Katsetulemuste kohaselt otsustati *Salmonella spp.* tuvastamisel kasutada PCR-reaktsioonis IAC-plasmide 10^2 molekuli ja kontrollplasmide 10^3 molekuli reaktsioonisegu kohta (joonised 3 ja 4).



Joonis 3. Kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-ST139/141 #12(284 bp) ja IAC-plasmidi pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 (457bp) molekulide arvu optimeerimine PCR-reaktsiooniks praimeripaariga 139/141 [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 9 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6 (pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 10^1 molekuli reaktsiooni kohta), nr 10–14 (pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 10^2 molekuli reaktsiooni kohta): pGEM-T-Easy-139/141 #12 10^1 - 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 7 (IAC 10^1 molekuli reaktsiooni kohta), 15 (IAC 10^2 molekuli reaktsiooni kohta): MQ + IAC; nr 8, 16 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].



Joonis 4. Kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7(429 bp) ning IAC-plasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 (213bp) molekulide arvu optimeerimine PCR-reaktsiooniks praimeripaariga ST11/ST15 [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 9 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6 (pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 10^1 molekuli reaktsiooni kohta), nr 10–14 (pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 10^2 molekuli reaktsiooni kohta): pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 10^1 - 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; NK (negatiivne kontroll) nr 1, 9: MQ; nr 7 (IAC 10^1 molekuli reaktsiooni kohta), 15 (IAC 10^2 molekuli reaktsiooni kohta): MQ + IAC; nr 8, 16 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].



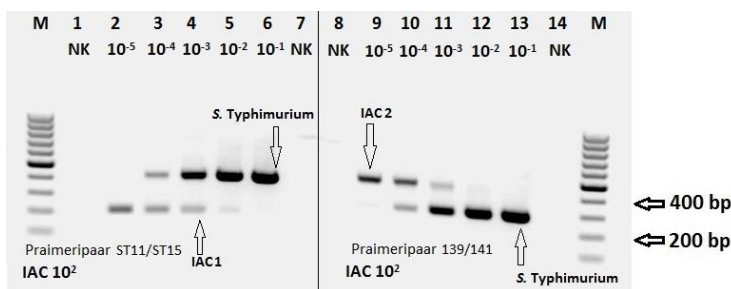
Joonis 5. Kontrollplasmiidide pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 (429 bp) ja pGEM-T-Easy-ST139/141 #12–(284 bp) ning vastavate IAC-plasmiidide pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 (IAC1 – 213 bp) ja pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #12 (IAC2 – 457 bp) molekulide arvu optimeerimine PCR-reaktsiooniks praimeritega ST11/ST15 ja 139/141 [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 9 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6 (pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 10^3 molekuli reaktsiooni kohta): pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 10^1 – 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 10–14 (pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 10^3 molekuli reaktsiooni kohta): pGEM-T-Easy-ST139/141 #12 10^1 – 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 7 (IAC1), 15 (IAC2): MQ + IAC 10^3 molekuli reaktsiooni kohta; nr 8, 16 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

2.3.2.3 Positiivse kontrollina kasutatava *Salmonella* spp. genoomse DNA optimaalse lahjenduse leidmine

Metoodikas kasutati lisaks kontrollplasmiididele veel positiivse kontrollina *Salmonella* Typhimurium genoomset DNA-d, mis võimaldab näidata produktide amplifitseerimist erinevatest molekulidest, mille kontsentratsiooni pole eraldamise metoodika eripära tõttu (kandjanukleinhappe lisamine) võimalik tavapäraselt määrata. Seetõttu määrati positiivse kontrollina kasutatava bakteriaalse DNA-lahuse optimaalne lahjendus reaktsioonisegus. PCR reaktsioonisegus kasutati *Salmonella* spp. genoomse DNA varulahuse kümnendlahjendusi 1:10 kuni 1:1000000, praimeripaare ST11/ST15 ja 139/141 ning praimeripaarile vastavat IAC-plasmidi 10^2 molekuli reaktsiooni kohta. PCR valmisseguna kasutati *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA*, $MgCl_2$ lõppkontsentratsiooniga 2 mM Kasutati PCR-programmi „SalmUUS” (peatükk 2.3.2.4).

Mõlema praimeripaari puhul osutus PCR reaktsioonisegus optimaalseks genoomse DNA varulahuse 1000-kordne lahjendus (joonis 6). IAC-plasmidi sisaldus 10^2 molekuli reaktsioonisegus andis nõrga IAC-PCR-produkti ja konkureeriv mõju sihtmärk PCR-produktile oli minimaalne (joonis 6, rajad 4 ja 11). Seega, lähtuvalt katse tulemustest kasutati edaspidistes

katsetes positiivse kontrollina *Salmonella* Typhimuriumi genoomse DNA proovi lahjendusega 1:1000.



Joonis 6. *Salmonella* spp. genoomse DNA optimaalse lahjenduse leidmine PCR reaktsioonisegus praimeripaaridega ST11/ST15 (429 bp) ja 139/141 (284 bp) sisemise amplifikatsiooni kontrollide (IAC) juuresolekul; IAC1=pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 (213 bp) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta; IAC2=pGEM-T-Easy-139/141-ins #1 (457 bp) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 7, 8, 14 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6: *S. Typhimurium* genoomse DNA lahjendused 1:100000 - 1:10 (praimeripaar ST11/ST15); nr 9–13: *S. Typhimurium* genoomse DNA lahjendused 1:100000-1:10 (praimeripaar 139/141)].

2.3.2.4 Sobiva PCR-programmi arendamine *Salmonella* spp. tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest

Optimaalse PCR-programmi arendamisel lähtuti Icosagen AS töötajate poolt eelnevalt kujundatud programmide ning nendega teostatud katsete andmetest. Kuna Icosagen AS poolt kujundatud PCR programmide „Salm” ja „Salmastm” (Lisa 5) tundlikkus oluliselt ei erinenud (joonised 1 ja 7), siis valiti välja nendest programm „Salm”, millel suurendati tsüklite arvu ning kujundati programm „SalmUUS”. Uut kujundatud programmi testiti ja võrreldi algupärase programmiga „Salm”.

Antud katses kasutati maatriksina praimeripaarile vastavat positiivset kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 (429 bp) lahjendustega 10^1 kuni 10^5 molekuli reaktsiooni kohta. Positiivseks kontrolliks oli *S. Typhimurium* genoomne DNA, negatiivseks kontrolliks MQ. Ühtlasi kontrolliti veelkord PCR reaktsioonisegus $MgCl_2$ kontsentratsiooni kasutades PCR valmisseguga *5x Solis Hot FirePol Blend PCR Master Mix* (Solis BioDyne, Eesti) koos praimeripaariga ST11/ST15 ja $MgCl_2$ lõppkontsentratsiooniga 2 mM või 2,5 mM.

PCR-analüüsides leiti, et tsüklite arvu suurendamine tõstis tuvastamistundlikkust, kusjuures PCR-produktid jäid diskreetseks ja ebaspetsiifilisi PCR-produkte ei tekkinud. PCR programmide „Salm” ja „SalmUUS” võrdluse tulemustest lähtuvalt otsustati edaspidi toidu- ja

keskkonnaproovide analüüsimiseks hakata kasutama nendest viimast, kuna antud programm omas samadel tingimustel suuremat tundlikkust (joonised 7 ja 8).

Optimeeritud PCR programm „SalmUUS”, *Salmonella* spp. tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest:

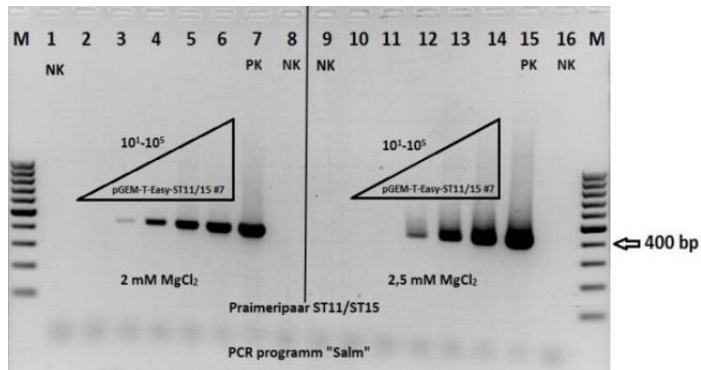
- Termotsükleri kaane kuumutus temperatuurini 99 °C
- 95°C 15 min – eelkuumutus HotStart-polümeraasi aktiveerimiseks

Järgnevat 3 etappi korratakse 34 tsüklit:

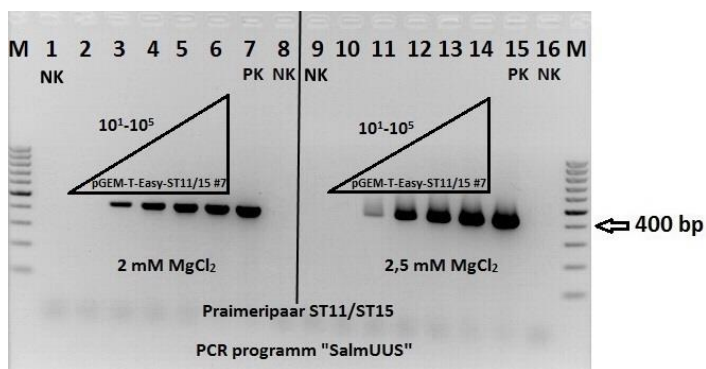
- 95°C 40 sek – DNA denaturatsioon
- 65°C 30 sek – praimerite seondumine
- 72°C 40 sek – DNA süntees

Programmi lõpetab:

- 72°C 5 min – järelsüntees
- 10°C HOLD – PCR proovi jahutamine



Joonis 7. PCR-analüüs programmiga „Salm”. Reaktsioonisegu sisaldas MgCl₂ lõppkontsentratsiooniga 2 mM või 2,5 mM praimeripaari ST11/ST15 ja vastavat kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 (429 bp) [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 8, 9, 16 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6, 10–14: pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 10¹-10⁵ molekuli reaktsiooni kohta; nr 7, 15 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium*; nr 1-8: 2 mM MgCl₂; nr 9-16: 2,5 mM MgCl₂].



Joonis 8. PCR-analüüs programmiga „SalmUUS”. Reaktsioonisegu sisaldas MgCl_2 lõppkontsentratsiooniga 2 mM või 2,5 mM praimeripaari ST11/ST15 ja vastavat kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 (429 bp) [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1, 8, 9, 16 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2–6, 10–14: pGEM-T-Easy-ST11/15 #7 10^1 – 10^5 molekuli reaktsiooni kohta; nr 7, 15 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium*; nr 1–8: 2 mM MgCl_2 ; nr 9–16: 2,5 mM MgCl_2].

Optimeeritud PCR-meetod *Salmonella* spp. tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest

Lähtuvalt varem optimeeritud PCR-meetodi parameetritest ja antud töö käigus optimeeritud PCR-tingimustest, määratleti PCR-meetod *Salmonella* spp. tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest. Selle kohaselt sisaldas PCR reaktsioonisegu, lõppmahuga 25 μl , PCR valmisseguga *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 10 mM MgCl_2* (Solis BioDyne, Eesti); MgCl_2 lõppkontsentratsiooniga 2,0 mM ja praimeripaari ST11/ST15 või 139/141, milles mõlema praimeri lõppkontsentratsiooniks on 0,4 μM . PCR-analüüside positiivseks kontrolliks kasutatakse plasmiidset DNA-d (pGEM-T-Easy-ST11/15#7 ning pGEM-T-Easy-ST139/141 #12) 10^3 molekuli reaktsiooni kohta või *S. Typhimurium*’i genoomset DNA-d lahjendusega 1:1000 (vastavat positiivset kontrolli lisatakse 10 μl PCR-reaktsiooni kohta). Vastavalt PCR-reaktsioonis kasutatavatele praimeritele lisatakse reaktsioonisegusse sisemise amplifikatsiooni kontrollina IAC-plasmide pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 või pGEM-T-Easy-139/141-ins #1 10^2 molekuli reaktsiooni kohta. PCR-analüüside negatiivse kontrollina kasutatakse kas MQ-d või Brauni vett (negatiivsele kontrollile ei lisata juurde IAC-d). *Salmonella* spp. tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest kasutati PCR programmi „SalmUUS” (peatükk 2.3.2.4).

DNA eraldamise kvaliteedi ja bakteriaalse DNA esinemise kontrollimiseks katseproovis viiakse läbi 16S rRNA geeni amplifitseerimine. Vastav PCR reaktsioonisegu, lõppmahuga 25 μl , sisaldab PCR valmisseguga *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 7,5 mM*

$MgCl_2$ (Solis BioDyne, Eesti; $MgCl_2$ lõppkontsentratsioon 1,5 mM), millele lisatakse juurde $MgCl_2$ (25 mM), et tagada PCR-reaktsiooni $MgCl_2$ lõppkontsentratsiooniks 2,5 mM. Praimeripaarina kasutatakse PCR1/PCR2 selliselt, et kummagi praimeri lõppkontsentratsioon on 0,4 μM . 16S rRNA geeni amplifitseerimiseks kasutatakse PCR programmi „16S rRNA vana” või „16S rRNA” (Lisa 5).

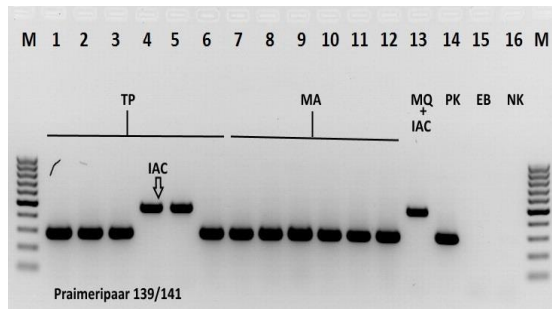
2.3.3 *Salmonella* spp. PCR-meetodi analüüsitulemused

2.3.3.1 PCR'i analüüsitulemused *Salmonella* spp. tuvastamisel kakao- ja šokolaaditoodetest

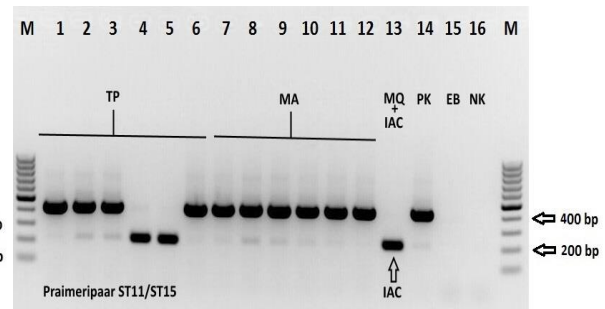
Kakao- ja šokolaaditoodete kategoorias analüüsiti kokku 98 katseproovi, millest 42 olid negatiivsed ning 60 positiivsed. Maatriksite pralineekompvekkide, tumeda šokolaadi ja piimašokolaadi Panda Maito nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe kas Typhimurium ja/või Enteritidis (Lisa 4).

Kategooria *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri määramisel nakatati piimašokolaadi Panda Maito *Salmonella* serotüübiga Typhimurium tuvastamiskiiri lähedase nakatamisannusega (1,2 cfu/25 g). Tuvastamiskiiri määramise katses osutusid kaks proovi kuuest negatiivseteks (joonis 9), mis võis tuleneda *Salmonella* bakterite mittekasvamisest või alla PCR-meetodi tundlikkuse piiri jäävast patogeenirakkude arvukusest eelrikastuses. Kõik nakatamata proovid andsid PCR-analüüsil tõesed negatiivsed tulemused, kuna IAC-produkt oli amplifitseeritud. Kakao- ja šokolaaditoodetest *Salmonella* spp. tuvastamise representatiivsed tulemused PCR-meetodiga on näidatud joonistel 9 ja 10.

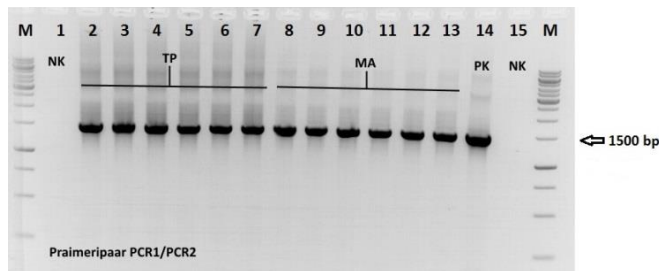
a)



b)



Joonis 9. Serotüübi *Salmonella* Typhimurium tuvastamine šokolaadist Pando Maito PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); vastavalt praimeripaarile on kõikide PCR-reaktsioonidele välja arvatud negatiivsetele kontrollidele (NK) juurde lisatud IAC-plasmiidi (sisemise amplifikatsiooni kontrolli plasmiidi) pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta; nr 1-6 TP (tuvastamispiir): nakatamisannus 1,2 cfu/25 g; nr 7-12 MA (madal arvukus): nakatamisannus 4 cfu/25 g; nr 13: MQ + IAC; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:50; nr 15: EB (elueerimispuhver); nr 16 NK (negatiivne kontroll): MQ].



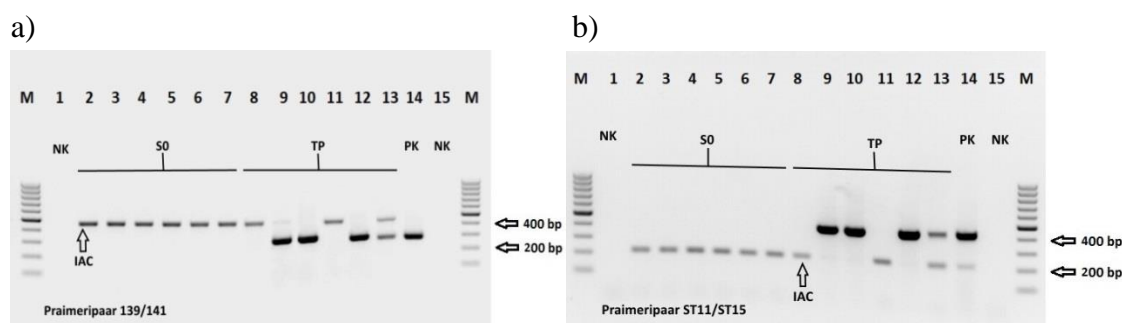
Joonis 10. Serotüübiga *Salmonella* Typhimurium nakatatud piimašokolaad Panda Maito bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni PCR-analüüsil praimeripaariga PCR1/PCR2 - 1500 bp [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); nr 1, 15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 TP (tuvastamispiir): nakatamisannus 1,2 cfu/25 g; nr 8-13 MA (madal arvukus): nakatamisannus 4 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:50].

2.3.3.2 PCR'i analüüsitulemused *Salmonella* spp. tuvastamisel maitseainetest

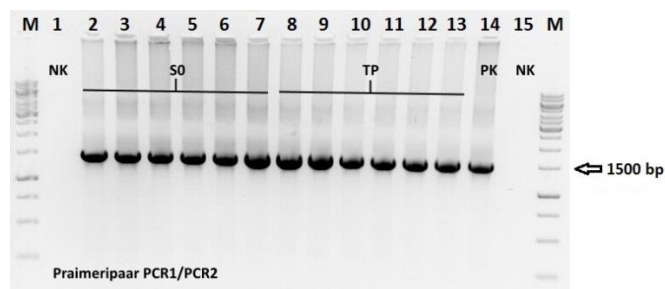
Maitseainete kategoorias analüüsiti kokku 72 katseproovi, millest 22 olid negatiivsed nakatamata ja 50 positiivsed. Maatriksite tšillipira, tšillipar Light'i ja sibulapulbri nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Agona ja/või Derby.

Tuvastamispiiri lähedase nakatamisannusega tehtud katses (1,3 cfu/25 g), kus tšillipart nakatati *Salmonella* serotüübiga Agona, osutusid kaks proovi kuuest negatiivseteks (joonis 11).

Mõlema proovi puhul oli tuvastatav amplifitseeritud IAC-produkt, mis välistab PCR-reaktsiooni inhibeerimisest tulenevad valenegatiivsed tulemused. Ülejäänute samasse kategooriasse kuulunud katseseeriade puhul olid ka kõigi positiivsete analüüsitud proovide PCR-produktid diskreetsed ja usaldusväärselt tuvastatavad. Kõik nakatamata proovid andsid PCR-analüüsil tõesed negatiivse tulemuse, kuna IAC-produkt oli amplifitseeritud. Maitseainetest *Salmonella* spp. tuvastamise representatiivsed tulemused PCR-meetodiga on näidatud joonistel 11 ja 12.



Joonis 11. Serotüübi *Salmonella* Agona tuvastamine tšillipiprast PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1,15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/25 g; nr 8-13 TP (tuvastamispriir): nakatamisannus 1,3 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

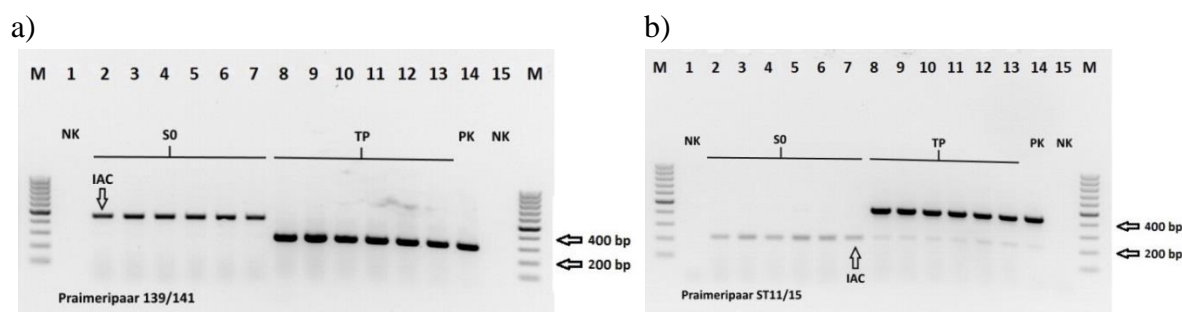


Joonis 12. Serotüübiga *Salmonella* Agona nakatatud tšillipipra bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni PCR-analüüsil praimeripaariga PCR1/PCR2 - 1500 pb [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); nr 1, 15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 TP (tuvastamispriir): nakatamisannus 1,3 cfu/25 g; nr 8-13 MA (madal arvukus): nakatamisannus 4 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

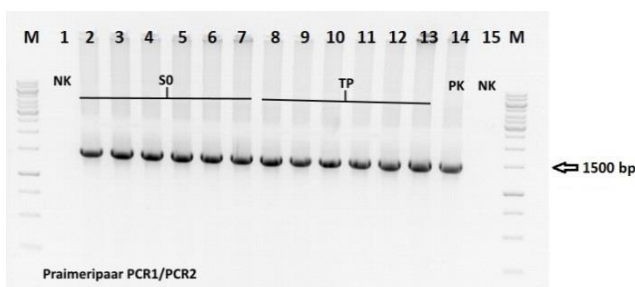
2.3.3.3 PCR'i analüüsitulemused *Salmonella* spp. tuvastamisel lihast

Lihatoodete kategoorias analüüsiti kokku 72 katseproovi, millest 18 olid negatiivsed ja 54 positiivsed. Maatriksite sealiha, ahjuvorstikesed astelpajupüreega ja lastevorsti nakatamiseks kasutati vastavalt *Salmonella* serotüüpe Enteritidis, Derby ja Newport (Lisa 4).

Joonisel 13 on näha nakatamata proovide PCR-produktid. Tulemused on tõesed negatiivsed, kuna IAC ja positiivsete kontrollide produktid on amplifitseeritud. Kõigi positiivsete analüüsitud proovide PCR-produktid olid diskreetsed ja usaldusväärselt tuvastatavad (joonis 13). Selle kategooria puhul nakatati tuvastamiskiiriga lähedase arvukusega ahjuvorstikesi astelpajupüreega (1,6 cfu/25 g), toorest sealiha (1,8 cfu/25 g) ja lastevorsti (1,2 cfu/25 g). Toorest sealiha nakatati *Salmonella* serotüübiga Enteritidis, ahjuvorstikesi astelpajupüreega serotüübiga Derby ja lastevorsti serotüübiga Newport. Lihast *Salmonella* spp. tuvastamise representatiivsed tulemused PCR-meetodiga on näidatud joonistel 13 ja 14.



Joonis 13. Serotüübi *Salmonella* Derby tuvastamine ahjuvorstikestest astelpajupüreega PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1,15 NK (negatiivne kontroll); MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/25 g; nr 8-13 TP (tuvastamiskiir): nakatamisannus 1,6 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll); *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

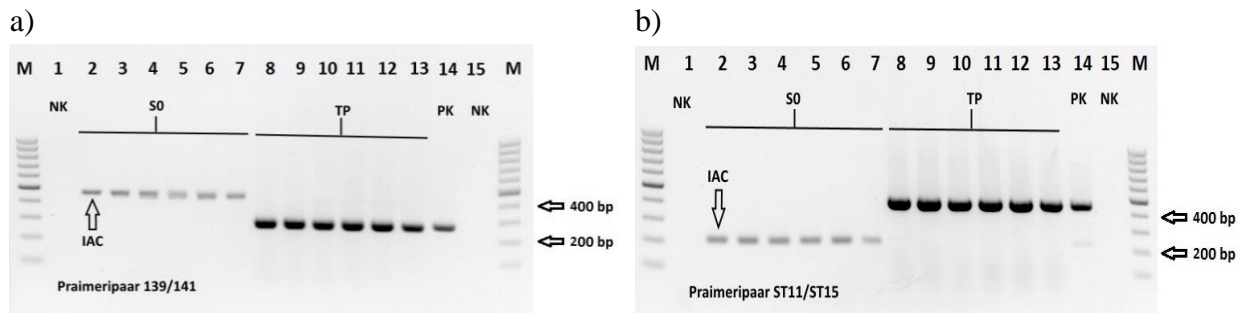


Joonis 14. Serotüübiga *Salmonella* Derby nakatatud ahjuvorstikesed astelpajupüreega bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni PCR-analüüsil primeripaariga PCR1/PCR2 – 1500 bp [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); nr 1, 15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/25 g; nr 8-13 TP (tuvastamiskiir): nakatamisannus 1,6 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

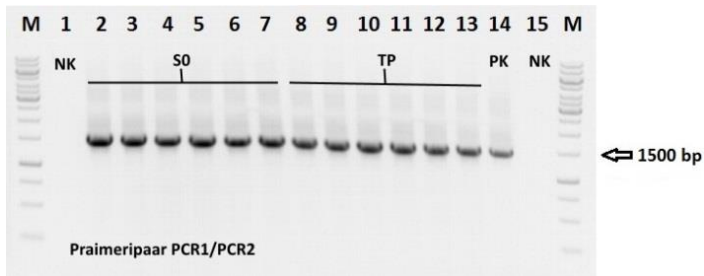
2.3.3.4 PCR'i analüüsitulemused *Salmonella* spp. tuvastamisel kanalihast

Kanaliha kategoorias analüüsiti kokku 84 katseproovi, millest 18 olid negatiivsed ja 66 positiivsed. Maatriksite grillkana ja kanalihasüldi nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Heidelberg ja/või Enteritidis (Lisa 4).

Salmonella spp. tuvastati kõigist kunstlikult nakatatud proovidest. Kõigi nakatatud katseproovide DNA amplifitseerimisel saadi usaldusväärsed *Salmonella* spetsiifilised PCR-produktid. Negatiivsete proovide puhul olid kõigil IAC-produktid näha, mis tõestab, et tegemist oli tõesete negatiivsete tulemustega (joonis 15). *Salmonella* spp. tuvastamiskiiri määramiseks kanalihatoodes kasutati toidumaatriksina grillkana ja serotüüpi *Salmonella* Heidelberg arvukusega 1,8 cfu/25 g. Kõik tuvastamiskiiri katseseeria proovid andsid PCR-analüüsil detekteeritava *Salmonella* spetsiifilise produkti. Kanaliha toodete puhul ei täheldatud PCR'i reaktsioonides inhibeerivaid mõjusid ja mõlema primeripaariga tehtud analüüsitulemused näitasid võrdväärse intensiivsusega amplifitseeritavaidprodukte. Seega, saavutati eelrikastusega kõikides katseproovides PCR-meetodiga tuvastatav bakterite arvukus. Kanalihast *Salmonella* spp. tuvastamise representatiivsed tulemused PCR-meetodiga on näidatud joonistel 15 ja 16.



Joonis 15. Serotüübi *Salmonella* Heidelberg tuvastamine grillkanast PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1,15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/25 g; nr 8-13 TP (tuvastamispriir): nakatamisannus 1,8 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].



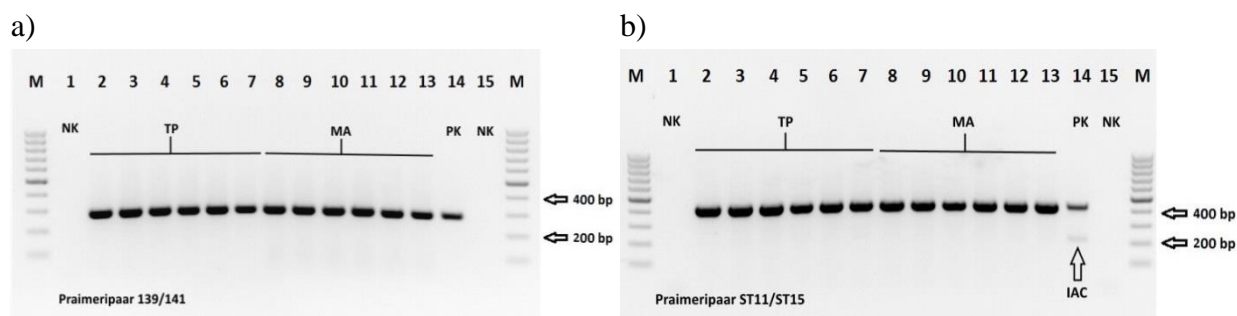
Joonis 16. Serotüübiga *Salmonella* Heidelberg nakatatud grillkana bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni PCR-analüüsil praimeripaariga PCR1/PCR2 – 1500 bp [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); nr 1, 15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/25 g; nr 8-13 TP (tuvastamispriir): nakatamisannus 1,8 cfu/25 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

2.3.3.5 PCR'i analüüsitulemused *Salmonella* spp. tuvastamisel keskkonnaproovidest

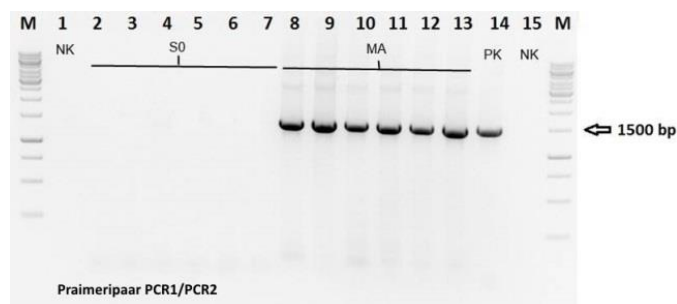
Keskkonnaproovide kategoorias analüüsiti kokku 84 katseproovi, millest 18 olid negatiivsed ja 66 positiivsed. Abrasiivsete käsnade (3M Microbiology, USA) nakatamiseks kasutati *Salmonella* serotüüpe Enteritidis, Infantis ja Typhimurium (Lisa 4).

Sõltumata nakatamiseks kasutatud *Salmonella* serotüübist ja nakatamisannusest tuvastati kõigi kunstlikult nakatatud proovide PCR-analüüsil spetsiifilised amplifitseeritud DNA produktid ja nakatamata proovide puhul IAC-produktid (joonised 17 ja 18). *Salmonella* spp. tuvastamispriiri määramiseks keskkonnaproovidest kasutati nakatamiseks serotüüpi *Salmonella* Infantis

arvukusega 1,5 cfu/11 g. Tuvastamiskiiriga lähedase arvukusega (1,5 cfu/11 g) nakatatud proovid olid PCR-analüüsil kõik positiivsed (joonis 17). Kõigi keskkonnaproovide kategooria kõrgemate nakatamisannustega katseproovide KA1 ja KA2 puhul saadi sarnase intensiivsusega PCR-produktid ning PCR-reaktsiooni inhibitsiooni ei täheldatud (joonis 19). Keskkonnaproovidest *Salmonella spp.* tuvastamise representatiivsed tulemused PCR-meetodiga on näidatud joonistel 17, 18 ja 19.

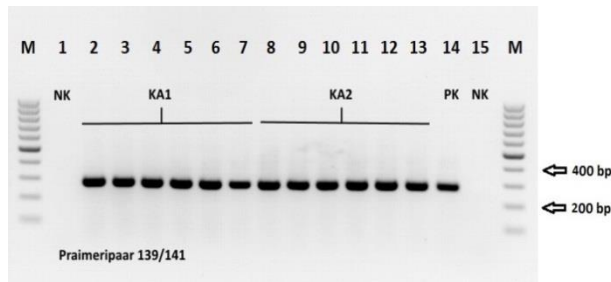


Joonis 17. Serotüübi *Salmonella* Infantis tuvastamine abarasiivsest käsnast PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1,15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/11 g; nr 8-13 TP (tuvastamiskiir): nakatamisannus 1,5 cfu/11 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

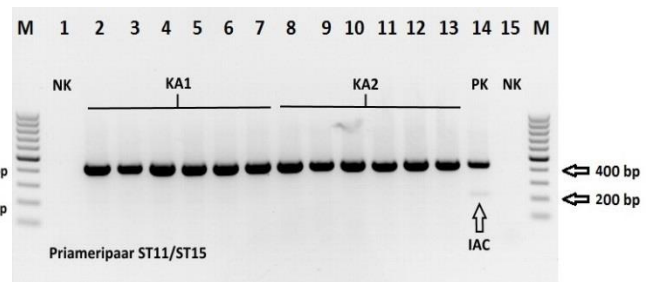


Joonis 18. Serotüübiga *Salmonella* Infantis nakatatud abrasiivse käsna bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni PCR-analüüsil praimeripaariga PCR1/PCR2 - 1500 bp [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); nr 1, 15 NK (negatiivne kontroll): Brauni vesi; nr 2-7: S0 (nakatamata proovid) 0 cfu/11 g; nr 8-13 MA (madal arvukus): nakatamisannus 14,4 cfu/11 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

a)



b)



Joonis 19. Serotüüpi *Salmonella* Enteritidis tuvastamine abarasiivsest käsnaast PCR-analüüsil praimeripaaridega 139/141- 284 bp (a) ja ST11/ST15 – 429 bp (b) ja vastavate IAC-plasmiididega pGEM-T-Easy-ST139/141-ins #1 - 457 bp (a) või pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp (b) 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1,15 NK (negatiivne kontroll): MQ; nr 2-7 KA1 (kõrge arvukus) nakatamisannus 72 cfu/11 g; nr 8-13 KA2 (kõrge arvukus): nakatamisannus 720 cfu/11 g; nr 14 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:1000].

2.3.4 Referentmeetodi ja PCR-meetodi (alternatiivmeetodi) võrdlev analüüs *Salmonella* spp. tuvastamiseks

Alternatiivmeetodi valideerimiseks ettenähtud standardi EVS-EN ISO 16140:2003 kohaselt testiti *Salmonella* spp. tuvastamist nii referent- kui ka PCR-meetodiga, kasutades paralleelkatsetes:

1. samasugust maatriksit
2. samasugust keskkonda s.t rikastamine viiakse läbi samas rikastuspuljongis, mis välistab erinevast maatriksist ja söötmest tuleneva erinevuse
3. nakatamiseks *Salmonella* spp. samasuguse arvukusega nakatamisannust kasteproovi kohta
4. ühes katseseerias sama *Salmonella* spp. serotüüpi

Samasugused katsetingimused võimaldavad tagada katsete korduvust.

Võrdleva analüüsi käigus määrati:

- alternatiivmeetodi suhteline täpsus, suhteline spetsiifilisus ja suhteline tundlikkus
- suhteline tuvastamiskiir alternatiiv- ja referentmeetodiga
- alternatiivmeetodi selektiivsus

2.3.4.1 *Salmonella* spp. tuvastamiseks kasutatava referentmeetodi ja PCR-meetodi (alternatiivmeetodi) võrdleva analüüsi tulemused

Standardi EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004 „Toidu ja loomasöödade mikrobioloogia Horisontaalmeetod *Salmonella* spp. tuvastamiseks” kohaselt teostati kõikide toidu- ja

keskkonnaproovide mikrobioloogilised analüüsid. Eelrikastuspuljongist teostati väljakülvid selektiivsöötmetele XLD ja BGA. Selektiivsöötmetel *Salmonella spp.* tüüpiliste kolooniate esinemisel viidi läbi kinnitavad biokeemilised testid, mille alusel tõestati *Salmonella spp.* esinemine või mitteesinemine proovis. PCR–analüüsil kasutati *Salmonella spp.* spetsiifilist praimeripaari ST11/ST15, mis amplifitseerib spetsiifilise produkti *Salmonella spp.* genoomi juhuslikust fragmendist suurusega 429 bp ja praimeripaari 139/141, mis amplifitseerib spetsiifilise produkti *Salmonella spp. invA* geenist suurusega 284 bp.

Katseskeem, nakatamisannus, nakatamiseks kasutatud *Salmonella spp.* serotüübid, katseproovide arv ja *Salmonella spp.* tuvastamise tulemused alternatiiv- ja referentmeetodil on ära toodud Lisas 4. Nii referent- kui ka PCR-meetodiga analüüsiti kokku 410 toidu- ja keskkonnaproovi, millest 300 katseproovi olid kunstlikult nakatatud ja nakatamata proove oli 110. Kõik nakatamata proovid olid mõlema meetodiga analüüsides negatiivsed. *Salmonella spp.* tuvastati 296 kunstlikult nakatatud proovist ja neli kunstlikult nakatatud proovi andsid negatiivse tulemuse. Kunstlikult nakatatud proovide nii referentmeetodi kui ka alternatiivmeetodiga saadud analüüsitulemused osutusid kattuvateks.

Salmonella spp. tuvastamise tulemused toidu- ja keskkonnaproovidest kattusid referent- ja alternatiivmeetodi puhul 100%. Mõlema meetodiga suudeti tuvastada nakatamata ja kunstlikult nakatatud proovid võrdväärselt (Lisa 4, Lisa 7 ja Tabel 4).

Tabel 4. Referent- ja alternatiivmeetodiga saadud katsetulemuste kokkulangevus selektiivrikastusest (EVS-EN ISO 16140:2003).

	Referentmeetod positiivne (R+)	Referentmeetod negatiivne (R-)
Alternatiivmeetod (A+)	R+/A+ Positiivsete tulemuste kokkulangevus (PA); PA = 296	R-/A+ = 0 Positiivne hälve (PD); PD = 0
Alternatiivmeetod (A-)	R+/A- = 0 Negatiivne hälve (ND); ND= 0	R-/A- Negatiivsete tulemuste kokkulangevus (NA); NA = 114

Suhtelise täpsuse (AC) - arvutamiseks kasutati võrrandit $AC = 100\% \times (PA + NA)/N$,

kus N on analüüsitud katseproovide arv; PA positiivsete tulemuste kokkulangevus, NA negatiivsete tulemuste kokkulangevus.

$$AC = 100\% \times (296 + 114)/410 = 100\%$$

Suhtelise spetsiifilisuse (SP) - arvutamiseks kasutati võrrandit $SP = 100\% \times NA/N-$, kus N- tähistab negatiivsete tulemuste kokkulangevuste ja positiivse hälbe summat ($NA+PD$)
 $SP = 100\% \times 114/114 = 100\%$

Suhtelise tundlikkuse (SE) - arvutamiseks kasutati võrrandit $SE = 100\% \times PA/N+$, kus N+ tähistab positiivsete tulemuste kokkulangevuse ja negatiivse hälbe summat ($PA+ND$)
 $SE = 100\% \times 296/296 = 100\%$

Meetodite võrdleval analüüsimisel ei tuvastatud erinevusi suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja spetsiifilisuse osas. Mõlema meetodi tulemused olid kõigi analüüsitud kategooriate puhul kokkulangevad 100%. Meetodite suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja suhtelise spetsiifilisuse tulemused on koondtabelina ära toodud Lisas 7.

2.3.4.2 Suhtelise tuvastamiskiiri määramine

Standardi kohaselt on suhteliseks tuvastamiskiiriks kultiveeritavate mikroorganismide väikseim arv, mida on katseproovist võimalik alternatiiv- ja referentmeetodiga tuvastada 50 % juhtudel. Suhtelise tuvastamiskiiri määramiseks on vajalik katseproove analüüsida vähemalt kolme erineva arvukusega ja kõiki kuues korduses. Standardis EN ISO 16140:2003 *Salmonella* spp. suhtelise tuvastamiskiiri määramiseks on nõutud katseproovide nakatamiseks vähemalt kolm nakatamisastet: 0 cfu katseproovi kohta, teoreetilisele tuvastamiskiirile lähedane arvukus ja tuvastamiskiirist kõrgem arvukus katseproovi kohta. Alternatiivmeetodi ulatuseks valiti 4 toiduproovide kategooriat ja üks keskkonnaproovide kategooria.

Salmonella spp. suhtelise tuvastamiskiiri määramiseks kasutati järgmiseid maatrikseid ja *Salmonella* serotüüpe (Lisa 4):

- kakao- ja šokolaaditoodete kategoorias piimašokolaadi Panda Maito ja serotüüpi *Salmonella* Typhimurium
- maitseainete kategoorias tšillipart ja serotüüpi *Salmonella* Agona
- lihatoodete kategoorias Lastevorsti, Ahjuvorstikesi astelpajupüreega ja toorest sealiha ning vastavalt serotüüpe *Salmonella* Newport, Derby, Enteritidis
- kanaliha kategoorias grillkana ja serotüüpi *Salmonella* Heidelberg
- keskkonnaproovide kategoorias hügieeniproovide võtmiseks kasutatavaid abrasiivseid käsnu ja serotüüpi *Salmonella* Infantis

PCR- ja referentmeetodiga saadi *Salmonella spp.* tuvastamise suhteliseks tuvastamispiiriks toidukategooriate puhul kokkuvõtvalt 1,1-1,3 cfu 25g katseproovi kohta ja keskkonnaproovide kategooria puhul 1,1 cfu ~11g katseproovi kohta. Suhtelised tuvastamispiiri statistilised näitajad arvutati Icosagen AS töötaja Karl Mumm poolt.

Suhtelise tuvastamispiiri tulemused kategooriate järgi olid järgmised:

- kakao-ja šokolaaditoodetel 1,1 [0,6 ; 2,0] cfu 25g katseproovi kohta,
- maitseainetel 1,3 [0,7 ; 2,7] cfu 25g katseproovi kohta,
- lihakategooria toodete 1,3 [1,3 ; 1,3] cfu 25g katseproovi kohta,
- kanaliha kategooria toodetel 1,3 [1,3 ; 1,3] cfu 25g katseproovi kohta,
- keskkonnaproovidel 1,1 [1,1 ; 1,1] cfu ~11g katseproovi kohta.

Suhtelise tuvastamispiiri määramiseks valitud maatriksid ja vastavad *Salmonella* serotüübid on ära toodud Lisas 4.

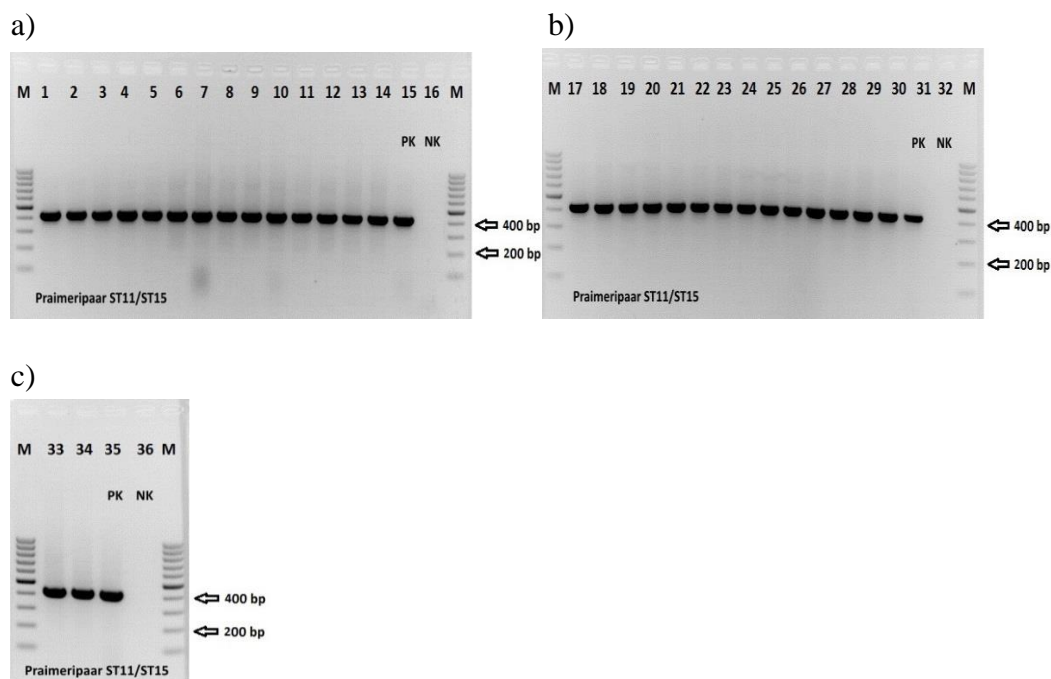
Kirjanduse andmetel on toidus *Salmonella spp.* eriti madalaks nakkusannuseks näidatud 1-3 cfu/g (Vought ja Tatini, 1998). Katsetulemustest lähtuvalt on mõlema meetodiga võimalik *Salmonella spp.* tuvastada toidust ja keskkonnaproovidest sama madala arvukusega bakteriaalse saastuse puhul.

2.3.4.3 PCR-meetodi selektiivsus ja spetsiifilisus

Alternatiivmeetodi kasutatavuse valideerimisel näidati antud töös kasutatava PCR-meetodi suutlikkust tuvastada *Salmonella spp.* erinevaid serotüüpe (*inclusivity*) ja samuti näidati mitte-sihtmärk bakterite tuvastamatust (*exclusivity*).

PCR-meetodi selektiivsuse hindamiseks testiti 30 *Salmonella spp.* serotüüpi (joonis 20), mis kõik olid PCR-meetodiga tuvastatavad ja spetsiifilisuse hindamiseks 30 mitte-sihtmärk mikroobi (joonis 21), mis ei andnud antud PCR-reaktsiooni tingimustel PCR-produkti. Praimeripaaridega ST11/ST15 ja 139/141 amplifitseeritud PCR-produktid olid katseproovis tuvastatavad ainult *Salmonella spp.* esinemisel proovis, mis tõestab meetodi selektiivsust. IAC-produkti olemasolu kõigis mitte-sihtmärkbakterite proovides kinnitab, et saadud tulemused ei olnud valenegatiivsed. Seega on praimeripaaride ST11/ST15 ja 139/141 kasutamine tõestatult *Salmonella spp.* spetsiifiline. Katse tulemused näitasid, et valideeritav PCR-meetod on

usaldusväärne, 100% inklusiivne ja 100% eksklusiivne, tagades selektiivsuse, mis võimaldab antud meetodiga spetsiifiliselt testida ainult perekonna *Salmonella* spp. eri serotüüpe. PCR-meetodi selektiivsuse analüüsi tulemused on koondtabelina ära toodud Lisas 6.



Joonis 20. *Salmonella* spp. tuvastamiseks PCR-meetodi selektiivsuse analüüs praimeritega ST11/15 – 429 bp ja vastava IAC-plasmiidiga pGEM-T-Easy-ST11/15-del #6 – 213 bp 10^2 molekuli reaktsiooni kohta [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); *Salmonella* spp. märklautüved: a) nr 1 - *S. Singapore* IS026, nr 2 - *S. Cerro* IS001, nr 3 - *S. Panama* IS028, nr 4 - *S. Derby* IS003, nr 5 - *S. Senegal* IS029, nr 6 - *S. Enterica subsp. enterica* VTL 7686, nr 7 - *S. Dublin* VTL 8006, nr 8 - *S. Newport* VTL 8210, nr 9 - *S. Typhimurium* VTL 8211, nr 10 - *S. Dublin* VTL 8212, nr 11 - *S. Derby* VTL 8234, nr 12 - *S. Heidelberg* VTL 8300, nr 13 - *S. Stanleyville* VTL 5333, nr 14 - *S. Stanleyville* VTL 5637, b) nr 17 - *S. Derby* VTL 6796, nr 18 - *S. Typhimurium* VTL 6797, nr 19 - *S. Infantis* VTL 6840, nr 20 - *S. Agona* VTL 7132, nr 21 - *S. Typhimurium* VTL 7157, nr 22 - *S. Enteritidis* VTL 7256, nr 23 - *S. Hadar* VTL 7260, nr 24 - *S. Enterica subsp. enterica* VTL 7298, nr 25 - *S. Derby* VTL 7320, nr 26 - *S. Typhimurium* VTL 7332, nr 27 - *S. Enteritidis* VTL 7401, nr 28 - *S. Infantis* VTL 7402 nr 29 - *S. Newport* VTL 7430, nr 30 - *S. Infantis* VTL 7498, c) nr 33 - *S. Chartres* VTL 7538, nr 34 - *S. Infantis* VTL 7666; nr 15, 31, 35 PK (positiivne kontroll): *S. Typhimurium* lahjendus 1:50; nr 16, 32, 36 NK (negatiivne kontroll): MQ].

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli optimeerida ja valideerida referentmeetodi suhtes alternatiivne PCR-meetod *Salmonella spp.* tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest. PCR-meetodi valideerimine hõlmas keskkonnaproovide kategooriat ja nelja erinevat toidukategooriat (kakao- ja šokolaaditoodete, maitseainete, kanalihatoodete ning lihatoodete kategooriaid). Lähtuvalt uurimistöö eesmärkidest oli PCR-metoodika valideerimiseks oluline järgida EN ISO 16140:2003 ja referentmeetodi EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004 standardites kehtestatud nõudeid. Kuna PCR-meetod võimaldab sihtmärkpatogeeni tuvastamist 24 tunni jooksul, on see võrreldes referentmeetodiga tunduvalt ajasäästlikum ning praegusel hetkel üheks paremaks alternatiiviks töömahukale mikrobioloogilisele referentmeetodile.

Kuigi PCR-meetod võimaldab täpset ja kiiret patogeeni tuvastamist analüüsitavatest proovidest, on selle meetodi puhul mitmeid optimeerimist vajavaid tegureid, mis võivad oluliselt mõjutada analüüsi tundlikkust, selektiivsust ja usaldusväärsust. PCR-meetod on usaldusväärne vaid juhul, kui katseproov on õigesti ettevalmistatud, eraldatud DNA on kvaliteetne ja huvipakkuvat sihtmärkorganismist pärinevat diagnostilist fragmenti on võimalik amplifitseerida. Antud töös optimeeriti alternatiivmeetodi (PCR-meetodi) erinevaid tingimusi ja parameetreid tagamaks *Salmonella spp.* usaldusväärset ja täpset tuvastamist toidu- ja keskkonnaproovidest. Näiteks mõjutab PCR-i spetsiifilisust ja robustsust oluliselt $MgCl_2$ kontsentratsioon reaktsioonisegus. Liiga kõrge $MgCl_2$ kontsentratsioon vähendab PCR-produktide diskreetsust. PCR reaktsioonisegus 3 mM lõppkontsentratsiooniga $MgCl_2$ tekitas hajusamad PCR-produktid (joonis 2), mida oli kirjeldatud ka kirjanduses (Zangenberg *et al.*, 1999). $MgCl_2$ lõppkontsentratsiooni alandamisel *Salmonella spp.* tuvastamise PCR reaktsioonisegus 2 mM saadi diskreetsed PCR-produktid (joonis 1).

Samuti on PCR diagnostikas väga oluline välistada vale-negatiivsete tulemuste saamine ja selle vältimiseks kasutatakse positiivseid kontrollproove kui ka sisemist amplifikatsiooni kontrolli (IAC). Kuna IAC- ja sihtmärkjärjestus konkureerivad reaktsioonisegus praimerite pärast, siis piisava tundlikkuse saavutamiseks ei tohiks IAC hulk olla reaktsioonisegus ülemäära suur. Seega on IAC-plasmiidi sisalduse optimeerimisel oluline saavutada tingimused, millega testitava sihtmärkgeeni DNA katseproovis ei jääks amplifitseerimata ning *Salmonella spp.* tuvastamata (Malorny *et al.*, 2003a). Käesolevas töös leiti, et optimaalseks IAC-plasmiidi sisalduseks PCR reaktsioonisegus konkureeriva PCR tingimustes, mis võimaldab *Salmonella spp.*

edukat tuvastamist ka madalate nakatamisannuste korral, on 10^2 IAC-plasmiidi molekuli reaktsiooni kohta (joonised 3 ja 4).

Erinevates toidumaatriksites varieerub looduslik mikrofloora ja PCR-reaktsiooni inhibeerivate ainete sisaldus küllaltki palju (Lantz *et al.*, 2000; Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997). Lisaks ei võimalda tava PCR-meetod eristada elusatest bakterirakkudest pärinevat DNA-d surnud rakkude omast. Elusate rakkude DNA amplifitseerimine on eriti oluline toiduainetööstuses ning seal nõutavas rutiinses kontrollis, kuna potentsiaalselt nakkusohtu kujutavad endast ainult elujõulised rakud. *Salmonella spp.* puhul on vähetõenäoline, et surnud rakkude kontsentratsioon on analüüsitavas proovis nii kõrge, et see oleks ilma eelneva rikastamiseta detekteeritav. *Salmonella spp.* leidub naturaalses toidu- ja keskkonnaproovides enamasti madala arvukusega. Seetõttu võib negatiivsete mõjurite korral kergesti tekkida ka olukord, kus kinnitatakse valenegatiivne tulemus (Odumeru ja León-Velarde, 2012).

PCR inhibitsiooni vältimiseks on välja arendatud erinevaid strateegiaid ja leitud mitmeid keemilisi ühendeid, mis võimaldavad edukalt vähendada PCR inhibiitorite mõju, tõsta reaktsiooni spetsiifilisust ning stabiilsust (Al-Soud ja Rådström, 2000; Pomp ja Medrano 1991). Üheks võimaluseks on toidu- ja keskkonnaproovide eelrikastamine enne DNA eraldamist, mis võimaldab bakterirakkudel taastuda erinevatest stressitingimustest ja tagada nende paljunemine (Odumeru ja León-Velarde, 2012; Oliveira *et al.*, 2003). Lisaks lahjeneb seeläbi surnud rakkude kontsentratsioon ning väheneb inhibiitorite negatiivne mõju. Samuti väheneb eelrikastuse kasutamisega ka mittesihhtmärk rakkude arv ~10 korda.

Käesoleva alternatiivmeetodi puhul on proovide eelrikastamine kõige aeganõudvam etapp, mille optimeerimine omab olulist rolli meetodika üldise ajakulu vähendamisel. Töös kasutatav eelrikastuse kestus 18 ± 2 h 37°C on piisav, et turgutada märklaudbaktereid ning tagada ka madala nakatamisannuse puhul patogeeni paljunemine arvukuseni, mis on PCR-meetodiga usaldusväärselt detekteeritav. Kirjanduses on kirjeldatud erinevaid edukaid *Salmonella spp.* tuvastamissüsteeme, kus eelrikastuse aega on vähendatud 12 ja isegi 4-6 tunnile (Ferretti *et al.*, 2001; Gouws *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000; Jitrapakdee *et al.*, 1995; Kwang *et al.*, 1996; Pathmanathan *et al.*, 2003). Eelrikastuse aja vähendamisel tuleb silmas pidada seda, et enamasti on PCR-meetodiga usaldusväärse *Salmonella spp.* tuvastamistulemuse saamiseks vajalik bakterirakkude arvukus suurusjärgus 10^2 – 10^3 cfu/ml (Jasson *et al.*, 2010). Käesolevas magistritöös optimeeritud PCR-meetodi tundlikkus jäi vahemikku 10^2 – 10^3 positiivse

kontrollplasmidi molekuli reaktsiooni kohta (joonised 1, 2, 3, 4, 7 ja 8) ja seda ka juhul kui PCR-proovile oli juurde lisatud sisemist amplifikatsiooni kontrolli molekulide arvuga 10^2 (joonised 3 ja 4). Antud PCR-meetodiga suudeti tuvastada *Salmonella spp.* kunstlikult nakatatud proovist juhul, kui nakatamiseks kasutati 1,2 cfu 25g analüüsitud katseproovi kohta ehk kõigest 0,048 cfu/g (joonis 9). Arvestades, et antud meetodika puhul oli juurde lisatud IAC-d ja *Salmonella spp.* suudeti tuvastada erinevatest analüüsitud toidumaatriksitest võrdväärselt, võib seda tundlikkust pidada küllaltki kõrgeks. Lähtuvalt PCR tundlikkusest ja sellest, et eelrikastusega tagatakse patogeeni paljunemine ning PCR-i inhibeerida võivate ainete hulga lahjenemine, võime eeldada, et eelrikastusest eraldatud DNA pärineb elusatest rakkudest ja tuvastamistulemus on usaldusväärne.

PCR-meetodi efektiivsus ja tundlikkus *Salmonella* bakterite tuvastamisel sõltub lisaks eelrikastusele ja proovide ettevalmistamisele veel mitmetest PCR-tingimustest nagu näiteks reagentide ja reaktsioonisegude valikust, praimeritest ning eraldatud DNA kvaliteedist. Malorny *et al.*, (2003a) testisid *Salmonella spp.* tuvastamiseks nelja varem avaldatud praimeripaari. Kõige selektiivsemad ja spetsiifilisemad tulemused saadi praimeripaariga 139/141, mille sihtmärkgeeniks on spetsiifiline invasiooni-seoseline geen *invA*, mis kodeerib *Salmonella spp.* patogeensusega seotud T3SS valke. Ka antud magistritöös valiti üheks praimeripaariks 139/141, mis näitas väga head 100% inklusiivsust ja eksklusiivsust. Käesolevas töös kasutati teise praimeripaarina ST11/ST15, mille amplifitseeritavaks järjestuseks on *Salmonella* spetsiifiline genoomne juhuslik fragment (Aabo *et al.*, 1993). Mõlemat praimeripaari oli varasemalt valideeritud Euroopa Food-PCR projekti raames (Malorny *et al.*, 2003a). Käesolevas magistritöös nende praimeripaaridega saadud tulemused andsid nii omavahelisel võrdlusel kui ka referentmeetodiga võrdlemisel ekvivalentsed tulemused. Kahe erineva praimeripaari kasutamine suurendab PCR tulemuste usaldusväärsust ja tagab suurema tõenäosusega õige analüüsitulemuse erinevate *Salmonella* serotüüpide puhul.

Antud töös analüüsiti paralleelselt referent- ja alternatiivmeetodiga kokku 410 proovi, millest 300 olid kunstlikult nakatatud. Nakatamata proove oli 110 ja negatiivseid katseproove kokku 114. Neljast kunstlikult nakatatud proovist *Salmonella spp.* ei leitud. Nende proovide nakatamisannustena kasutati *Salmonella* tuvastamisprii lähedasi arvukusi (kakao- ja šokolaaditoodete kategooria puhul 1,2 cfu/25 g ning maitseainete kategooria puhul 1,3 cfu/25 g). Kõigi negatiivsete PCR-i analüüsitulemuste puhul olid amplifitseeritud IAC-produktid, mis

andsid usaldusväärne kinnituse, et tegu on tõeliste negatiivsete tulemustega. Saadud tulemus lubab eeldada, et valenegatiivsete tulemuste saamise tõenäosus antud meetodiga on väga madal. Uuringus läbiviidud alternatiiv- ja referentmeetodil saadud tulemuste võrdlemine näitas 100% kattuvust. Selline tulemus oli tuvastamiskiiruse lähedastest nakatamisannustest (antud töö kontekstis 1-2 cfu/25 g) kõrgemate arvukuste puhul ootuspärane, kuna eelnevalt kirjeldatud uuringutes on näidatud, et proovide nakatamisel 5 ja rohkema rakuga, tagab eelrikastus piisava *Salmonella* bakterite arvukuse, mis võimaldab saada usaldusväärse tuvastamistulemuse PCR-meetodiga (Al-Harhi *et al.*, 2012; Ferretti *et al.*, 2001; Gouws *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000; Jitrapakdee *et al.*, 1995; Kwang *et al.*, 1996; Malorny *et al.*, 2003b; Oliveira *et al.*, 2003; Sánchez-Jiménez ja Cardona-Castro, 2004; Pathmanathan *et al.*, 2003). Käesolevas töös *Salmonella spp.* tuvastamiskiiruse määramisel erinevatest toidu- ja keskkonnaproovidest kasutati nakatamisannusena kõigest 1-2 cfu analüüsitava proovi kohta, millega saadi PCR-meetodil referentmeetodiga võrreldes 100% ekvivalentsed tulemused.

Katsetega näidati, et antud töös arendatud alternatiivmeetod on *Salmonella spp.* tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest efektiivne ja sama usaldusväärne kui referentmeetod. Toetudes magistr töö tulemustele võib väita, et antud PCR-meetod on usaldusväärne ja kasutatav *Salmonella spp.* kiiremaks tuvastamiseks ajakuluka mikrobioloogilise meetodiga võrdväärselt.

KOKKUVÕTE

Salmonella bakterid on maailmas ühed ohtlikumad ning sagedasemad toiduga levivad patogeenid. Eriti ohtlikuks muudab neid võime kohaneda ekstreemsete tingimustega, mistõttu on nad küllaltki vastupidavad erinevatele füüsikalistele ja keemilistele mõjuritele, sealhulgas ka toidutöötlemisele (D'Aoust *et al.*, 2001). Seepärast peetakse *Salmonella spp.* toiduohutuse tagamisel jätkuvalt üheks peamiseks patogeeniks. Hinnanguliselt on maailmas üle 1,3 miljardi salmonelloosi juhtumi aastas (Bhunja, 2008), millest rohkem kui 95% on toidutekkelised (Mead *et al.*, 1999). Kuna mikrobioloogilise standardmeetodiga läheb *Salmonella spp.* positiivse tulemuse kinnitamiseks toidust ja keskkonnaproovidest kuni kuus päeva (Ferretti *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2003a), esineb tungiv vajadus alternatiivsete meetodite väljatöötamiseks, mis aitaksid kiiremini patogeeni tuvastada, teha kindlaks haiguskoldeid ning tagada efektiivsemalt üldist toiduohutust.

Käesoleva magistritöö käigus optimeeriti ja valideeriti PCR-metood *Salmonella spp.* tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovide eelrikastusest eraldatud DNA-dest. See meetod võimaldab *Salmonella spp.* usaldusväärset ja kiiret tuvastamistulemust 24 tunni jooksul. Antud töö hõlmas nii PCR'i optimeerimist kui ka antud meetodi valideerimist vastavalt rahvusvahelise standardi EN ISO 16140:2003 normatiividele referentmeetodi EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004 suhtes. Alternatiivmeetodit valideeriti kakao- ja šokolaaditoodete, maitseainete, kanalihatoodete, lihatoodete ning keskkonnaproovide kategooriate ulatuses.

Uurimistöös analüüsiti kokku nii alternatiiv- kui standardmeetodiga 410 katseproovi, millest 110 olid nakatamata proovid ja 300 kunstlikult nakatatud proovid. Proovide kunstlikuks nakatamiseks kasutati 7 erinevat *Salmonella spp.* serotüüpi: *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Infantis*. Analüüsitud 410-st katseproovist olid 296 positiivsed ja 114 negatiivsed. Kõik töö käigus analüüsitud 30 *Salmonella spp.* serotüüpi olid PCR-meetodiga tuvastatavad ja 30 mitte-sihtmärkbakterit, kas samast sugukonnast või toidus esineda võivatest bakteritest, ei olnud meetodis kasutatavatel PCR-reaktsiooni tingimustel tuvastatavad. Sellega näidati, et antud PCR-meetod on 100% selektiivne. Kõik PCR-meetodiga saadud tulemused olid ekvivalentsed referentmeetodi tulemustega. Läbiviidud referent- ja alternatiivmeetodi võrdleva analüüsiga, millega hinnati PCR-metoodika kasutatavust, leiti, et arendatud alternatiivse meetodi suhteline spetsiifilisus, suhteline täpsus ja suhteline tundlikkus on

100%. PCR-meetodil *Salmonella spp.* suhteline tuvastamiskiir keskkonnaproovides oli 1,1 cfu ja toiduproovides 1,1-1,3 cfu analüüsitud proovi kohta.

Käesolevas magistritöö tulemustest lähtuvalt võib väita, et valideeritud alternatiivmeetod on robustne ja usaldusväärne. Antud meetodika peamine väärtus seisneb märkimisväärses ajavõidus, võimaldades täpset ja võrreldes mikrobioloogilise meetodiga, kuni 5 päeva kiiremat *Salmonella spp.* tuvastamist toidu- ja keskkonnaproovidest. Lisaks tunnistati antud PCR-meetod 29. aprillil 2014 akrediteerituks EAK (Eesti Akrediteerimiskeskus) poolt, millega kinnitati meetodika vastavus valideerimise nõuetele. Seega omab antud magistritöö praktilist väärtust, mille tulemused on rakendatavad (ja on juba rakendatud) mikrobioloogia labori rutiinses töös.

Validation of PCR-method for detection of *Salmonella* spp. in food and environmental samples

Markus Pappa

SUMMARY

Salmonella bacteria are one of the leading and most commonly occurring foodborne pathogens worldwide. *Salmonella* readily adapts to extreme conditions, which makes it highly resistant to various physical and chemical agents, including stress factors utilized in food processing (D'Aoust *et al.*, 2001). Therefore, *Salmonella* spp. is considered as the main threat for food safety. There are more than 1,3 billion annual cases of salmonellosis worldwide (Bhunia, 2008) and it is estimated that of all *Salmonella* infections, the rate of foodborne transmission is greater than 95% (Mead *et al.*, 1999). Traditional methods used to obtain the confirmed result from food or environmental samples are time-consuming, requiring up to 6 days (Ferretti *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2003a). Thus, there is a need for rapid alternative methods to determine the outbreak sources, to provide rapid pathogen detection and to ensure the effectiveness of the overall food safety.

The purpose of this thesis was the optimization and validation of a rapid 24 h PCR-method for detecting *Salmonella* spp. from the extracted DNA of pre-enriched food and environmental samples, according to international standard EN ISO 16140:2003 and its comparison to the reference method EVS-EN ISO 6579:2003/Cor.1:2004. The scope of the validation involved 4 food categories (including cocoa and chocolate products; herbs; poultry products; meat products) and a category of environmental samples.

Altogether 410 samples were analyzed by both, reference and PCR-method, of which 300 were artificially contaminated and 110 were natural, uncontaminated samples. 7 *Salmonella* spp. serotypes (*S. Agona*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Infantis*), relevant to chosen categories, were used for inoculation procedures. All 30 *Salmonella* spp. strains tested were detected and all 30 non-*Salmonella* strains were undetectable by the PCR, indicating that the developed PCR-method is 100% selective and specific. The results obtained with the alternative method were found equivalent to the reference method. Comparative study of two methods showed that statistical parameters, including relative specificity, relative sensitivity, and relative accuracy had 100% concordant values. The relative detection limit for food

categories in general was obtained as 1,1-1,3 cfu per 25 g of analyzed sample and for environmental category respectively 1,1 cfu per analyzed sample.

Based on the results of the current thesis, it is shown that the developed alternative PCR-method is rapid, reliable and enables detection of *Salmonella spp.* in food and environmental samples. Consequently, the current method has been accredited by Estonian Accreditation Centre for detection of *Salmonella spp.* in food and environmental samples and is applicable for routine use in microbiology laboratory.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid Ene Talpseppa ja Eerik Jõgi lõputöö juhendamise ja igakülgse abi eest.

Lisaks tahan avaldada tänu veel abivalmiduse ning heade nõuannete eest Icosagen AS töötajatele Gaily Kivi, Tatjana Verst, Andres Männik, Karl Mumm ning Urve Toots.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aabo, S., Rasmussen, O. F., Rossen, L., Sorensen, P. D. and Olsen, J. E. (1993). *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 7:171–178.
- Al-Harthi, O.M., Halawani, E. M. and Abdelkader, H. S. (2012). Detection of *Salmonella* strains in clinical samples from Saudi Arabia by *invA* and *hlyA* polymerase chain reaction (PCR)-based assays. Afr. J. Microbiol. Res. 6(25): 5410-5416.
- Al-Soud, W. A. and Rådström P. (2000). Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. J. Clin. Microbiol. 38(12): 4463–4470.
- Andrews, H. L. and Baumber, A. J. 2005. *Salmonella* species, p. 327-338. In Fratamico, P. M., Bhunia, A. K. and Smith, J. L. (ed.). *Foodborne pathogens: Microbiology and molecular biology*. Horizon Scientific Press: United Kingdom.
- Barrell, R. A. (1988). The survival and recovery of *Salmonella* typhimurium phage type U285 in frozen meats and tryptone soya yeast extract broth. Int. J. Food Microbiol. 6(4): 309-316.
- Bell, C. and Kyriakides, A. (2002). *Salmonella: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods*. Blackwell Publishing: Oxford, United Kingdom. p. 336.
- Benoit, P. W. and Donahue, D. W. (2003). Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment. J. Food Prot. 66: 1935-1948.
- Bhunia, A. K. (2008). *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*. Springer Science and Business Media: United States of America, LLC.
- Bouchrif, B., Paglietti, B., Murgia, M., Piana, A., Cohen, N., Ennaji, M., Rubino, S. and Timinouni, M. (2009). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. J. Infect. Dev. Ctries. 28(3): 35-40.
- Burkhalter, P. W., Müller, C., Luthy, J. and Candrian, U. (1995). Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. J. AOAC Int. 78: 1531–1537.

Champoux, J. J., Neidhardt F. C., Plorde J. J., Drew W.L. (2004). Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease. Ryan, K. J. and Ray, C. G. (ed.), 4th ed., McGraw-Hill: New York.

Chiou, C. S., Huang, J. F., Tsai, L. H., Hsu, K. M., Liao, C. S. and Chang, H. L. (2006). A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54(4): 315–317.

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4): 840–862.

Cordier, J-L. (1994). HACCP in the chocolate industry. *Food Control*, Vol. 5, 3:171–175.

D'Aoust, J. Y. 2000. *Salmonella*, p. 1233-1299. In Lund, B. M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G. W. (ed.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. 2. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland.

D'Aoust, J. Y., Maurer, J. and Bailey, J. S. 2001. *Salmonella* species, p. 141-178. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D. C.

D'Aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 14–70.

Davidson, P.M. 2002. Foodborne Diseases, p. 7-30. In Hui, Y. H., Bruinsma, L. B., Gorham, J. R., Nip, W.-K., Tong, P. S. and Ventresca, P. (ed.), *Food Plant Sanitation*. CRC Press, New York: Marcel Dekker, Inc.

Doran, J. L., Collinson, S. K., Burian, J., *et al.* (1993). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2263–2273.

European Food Standards Agency (EFSA), (2010). "Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella* Typhimurium-like" strains". *EFSA Journal* 2010; 8(10):1826.

- Feldsine, P., Abeyta, C. and Andrews, W. (2002). AOAC International Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. AOAC International, OMA Program Manual.
- Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G. and Clementi, F. (2001). Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. Appl. Environ. Microbiol. 67: 977-978.
- Galán, J. E. and Curtiss, R. 3rd. (1991). Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. Infect. Immun. 59: 2901-2908.
- Gouws, P. A., Visser, M. and Brözel, V. S. (1998). A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. J. Food Prot. 61: 1039-1042.
- Gray, J. T. and Fedorka-Cray, P. J. 2002. *Salmonella*, p. 55-68. In Bouchrif, D. O. and Riemann, H. P. (ed.). *Foodborne diseases*. Academic Press.: San Diego.
- Grimont, P. A. D. and Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur: France.
- Guan, T. Y. and Holley, R. A. (2003). Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness. J. Environ. Qual. 32(2): 383-392.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A. and Weill, F.-X. (2009). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol, 161, 26-29.
- Guo, X., Chen, J., Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. (2000). PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. Appl. Environ. Microbiol. 66(12): 5248-52.
- Hanes, D. 2003. Nontyphoid *Salmonella*, p. 137-149. In Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H and Vogt, P. H. (ed.), *International handbook of foodborne pathogens*. New York, Marcel Dekker, Inc.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. and Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1863-1868.

ISO (2003a). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (EVS-EN ISO 6579:2003/cor.1:2004). International Organization for Standardization.

ISO (2003b). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods (EN ISO 16140:2003). International Organization for Standardization.

ISO (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions (ISO 22174:2005). International Organization for Standardization.

ISO/IEC (2006). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (EVS-EN ISO/IEC 17025:2006). International Organization for Standardization; International Electrotechnical Commission

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. and Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 27: 710-730.

Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. (2005). Review of Modern Food Microbiology. 7th ed., Springer Verlag.

Jitrapakdee, S., Tassanakajon, A., Boonsaeng, V., Piankijagum, S. and Panyim, S. (1995). A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. *Mol Cell Cell Probe* 9: 375–382.

Jones, Y. E., McLaren, I. M. and Wray, C. 2000. Laboratory aspects of *Salmonella*. In Wray, C. and Wray, A. (ed.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom.

Kapil, K., 2011. Method Development and Validation of Analytical Procedures p. 3-16. In Shoyama Y. (ed.), Method Development and Validation of Analytical Procedures, Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Rijeka, Croatia, InTech.

- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M. A. and Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2597-2604
- Kothary, M. H. and Babu, U. S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *J. Food Saf.* 21: 49-73.
- Kramarenko T., Nurmoja I., Kärssin A., Meremäe K., Hörman A. and Roasto M. (2014). The prevalence and serovar diversity of *Salmonella* in various food products in Estonia. *Food Control.* 42:43–47.
- Kwang, J., Littledike, E. T. and Keen, J. E. (1996). Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 46–51
- Lane, D., 1991. 16S/23S rRNA Sequencing, p. 115 – 165. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons.
- Lantz, P. G., al Soud, W. A., Knutsson, R., Hahn-Hagerdal, B. and Rådström, P., (2000). Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol. Annu. Rev.* 5: 87–130.
- Lantz, P. G., Hahn-Hägerdal, B. and Rådström, P. (1994). Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends. Food Sci. Technol.* 5: 384-389.
- Makino, S., Kurazono, H., Chongsanguam, M. (1999). Establishment of the PCR system specific to *Salmonella spp.* and its application for the inspection of food and fecal samples. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 1245–1247.
- Malorny, B., Cook, N., D'Agostino, M., De Medici, D., Croci, L., Abdulmawjood, A., Fach, P., Karpiskova, R., Aymerich, T., Kwaitek, K., Kuchta, T. and Hoorfar, J. (2004). Multicenter validation of PCR-based method for detection of *Salmonella* in chicken and pig samples. *J. AOAC Int.* 87: 861-866.

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. and Helmuth, R. (2003a). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 290-296; 139-141.

Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C. and Helmuth, R. (2003b). Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 241-249.

Maurer, J. J. (2006). PCR Methods in Foods, p. 62-65. Springer, New York, N.Y.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V., (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625.

Myint, M. S., Johnson, Y. J., Tablante, N. L. and Heckert, R. A. (2006). The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol.* 23: 599-604.

Odumeru, J. A. and León-Velarde, C. G. (2012). *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. In Dr. Barakat, S. M. M. (ed.), *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. ISBN: 978-953-307-782-6, InTech, DOI: 10.5772/29526.

Oliveira, S. D., Rodenbusch, C. R., Cé, M. C., Rocha, S. L. S. and Canal, C. W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 217-221

Oliveira, S. D., Santos, L. R., Schuch, D. M., Silva, A. B., Salle, C. T. and Canal, C. W. (2002). Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87(1):25-35.

Pathmanathan, S. G., Cardona-Castro, N., Sánchez-Jiménez, M. M., Correa-Ochoa, M. M., Puthucheary, S. D. and Thong, K. L. (2003). Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hlyA* gene. *J. Med. Microbiol.* 52(9): 773-6.

- Pomp, D., and Medrano, J. F. (1991). Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 10: 58–59.
- Porwollik, S., Boyd, E. F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. (2004). Characterization of *Salmonella* enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bacteriol.* 186(17): 5883-5898.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M. S., Ubong, A., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K. and Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Int Food Res J.* 18: 465-473.
- Radji, M., Malik, A. and Widyasmara, A. (2010). Rapid detection of *Salmonella* in food and beverage samples by polymerase chain reaction. *Malays. J. Microbiol.* 6(2): 166-170.
- Rådström, P., Löfström, C., Lövenklev, M., Knutsson, R. and Wolffs, P. (2008). Strategies for overcoming PCR inhibition. *CSH Protoc*; pdb.top20. doi: 10.1101/pdb.top20, New York.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss, R., III and Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6: 271-279.
- Rao, J. R., Fleming, C. C. and Moore, J. E. (2006). *Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications*, p. 94-111. Horizon Scientific Press, United Kingdom.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K. and Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37–45.
- Roux, KH., (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *CSH Protoc*; pdb.ip66. doi: 10.1101/pdb.ip66, New York.
- Sachadyn, P. and Kur, J. (1998). The construction and use of a PCR internal control. *Mol. Cell. Probes.* 12: 259-262.

- Sánchez-Jiménez, M. M. and Cardona-Castro, N. (2004). Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the *hlyA* gene in clinical samples from Colombian patients. *J Med Microbiol.* 53(9): 875-8.
- Scherer, C. A. and Miller, S. I. 2001. Molecular pathogenesis of *Salmonellae*, p. 265-316. *In* Groisman. E. A. (ed.), *Principles of bacterial pathogenesis*. Academic Press: United States of America.
- Smith, N. H. and Selander, R. K. (1991). Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3): 956–960. PMID: PMC50933
- Soumet, C., Ermel, G., Fach, P. and Colin, P. (1994). Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 294-298
- Su, L. H. and Chiu, C. H. (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Keng I Hsueh.* 30(3): 210-219.
- Valdez, Y., Ferreira, R. B. R. and Finlay, B. B. (2009). Molecular Mechanisms of *Salmonella* Virulence and Host Resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 337, p 93-127.
- Vought, K. J. and Tatini, S. R. (1998). *Salmonella* Enteritidis contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *J. Food. Prot.* 61:5-10.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741–3751.
- Yousef, A. E. and Carlstrom, C. 2003. *Salmonella*, p. 167-205. *In* Yousef, A. E. and Carlstrom, C. (ed.), *Food microbiology: A laboratory manual*. John Wiley and Sons: New Jersey, Inc.

Zangenberg, G., Saiki, R. and Reynolds, R. (1999). Multiplex PCR: Optimization Guidelines, p. 73-95. *In* Innis M.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J. (ed.), Applications: Protocols for Functional Genomics. Academic Press, San Diego.

Ziemer, C. J. and Steadham, S. R. (2003). Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 463– 469.

Zweifel, C. and Stephan, R. (2012). Spices and herbs as source of *salmonella*-related foodborne diseases. *Food Res. Int.* 45(2): 765-769.

KASUTATUD VEEBILEHED

Veebileht 1. DuPont. BAX® System PCR Assay for Salmonella.

http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/bax_salmonella_testing.html

Veebileht 2. European Food Standards Agency (EFSA). Fact sheet: EFSA explains zoonotic diseases - Salmonella. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>

Veebileht 3. iMicroQ, QFast® Salmonella Kit.

<http://www.imicroq.com/qfast-salmonella-2/>

Veebileht 4. Nordval, (2009). Protocol for the validation of alternative microbiological methods. National Veterinary Institute.

<http://www.nmkl.org/NordVal/NordValprotocolmarch2009.pdf>

Veebileht 5. Terviseamet.

<http://www.terviseamet.ee/nakkushaigused/nakkushaigustesse-haigestumine.html>

LISA

Lisa 1. PCR-meetodi optimeerimise protsessis testitud kommertsiaalsed PCR valmissegud

- *Fermentas* PCR Master Mix 2 mM MgCl₂*
- *Smart-Taq Hot Red 2X PCR Mix 2 mM MgCl₂*
- *5x Solis Hot FIREPol Blend PCR Master Mixi 2,5 mM MgCl₂*
- *5x Solis FIREPol 5x Master Mix 2,5 mM MgCl₂*

Lisa 2. PCR valmissegu *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 10 mM (või 7,5 mM; 12,5 mM) MgCl₂* reaktsioonisegu koostis

- *HOT FIREPol®* DNA polümeraas
- *Proofreading* ensüüm
- *5x Blend Master Mix* puhver
- vastavalt 7,5 mM, 10 mM MgCl₂

Lisa 3. Praimerite ST11, ST15, 139 ja 141 iseloomustus

Primer: ST11

Primer Information -----

Sequence: 5' AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3'
Length: 25
Meets criteria: No
Composition: A: 8 C: 7 G: 5 T: 5
Molar absorbance: 31.5 ug/ml = 1 OD260
Linked molecule: No molecule association

Primer Evaluation and Criteria Settings -----

Criteria =	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	48	No
Tm C	Range 55-80	70	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	3	No
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	5	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5'vs3'	-1.1	No
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	0	No
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

ST15

Primer: ST15

Primer Information -----

Sequence: 5' GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG 3'

Length: 24

Meets criteria: No

Composition: A: 6 C: 5 G: 8 T: 5

Molar absorbance: 31.2 ug/ml = 1 OD260

Linked molecule: No molecule association

Primer Evaluation and Criteria Settings -----

		This	Meets
Criteria =	PCR Primer	Primer	Criteria
% GC	Range 50-60	54	Yes
Tm C	Range 55-80	66	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	3	No
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5'vs3'	3.2	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

139

Primer: 139

Description: InvA

Primer Information -----

Sequence: 5' GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA 3'

Length: 26
 Meets criteria: No
 Composition: A: 7 C: 6 G: 7 T: 6
 Molar absorbance: 31.4 ug/ml = 1 OD260
 Linked molecule: No molecule association

Primer Evaluation and Criteria Settings - - - - -

Criteria =	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm C	Range 55-80	70	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kJ/mol 5'vs3'	1.1	No
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	0	No
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

141

Primer: 141
 Description: InvA

Primer Information - - - - -

Sequence: 5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3'
 Length: 22
 Meets criteria: Yes
 Composition: A: 7 C: 8 G: 4 T: 3
 Molar absorbance: 31.5 ug/ml = 1 OD260
 Linked molecule: No molecule association

Primer Evaluation and Criteria Settings - - - - -

Criteria =	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	54	Yes
Tm C	Range 55-80	67	Yes
3' Dimers	< 3 matches 3'end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	2	Yes
Stability	>= 1.2 kJ/mol 5'vs3'	1.6	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	2	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55 C	none	Yes
Worst-case False Priming C		n/a	

Lisa 4. Analüüsitava maatriksi inokuleerimisskeem, katseproovide arv ja analüüsi tulemus

Proovi tähis ja korduste arv	Nakatamisannus cfu/25 g maatriksi kohta	TULEMUS	
		REF	PCR
Nakatatud maatriks + <i>Salmonella</i> spp. serotüüp; katse alustamise kuupäev			
Kakao- ja šokolaaditoodete kategooria			
12-0780; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0794; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0841; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0864; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0904; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0917; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0954; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-0999; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
12-1015; korduseid 2	nat; nak	2EL	2EL
Piimašokolaad Panda Maito + <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 WDMC 00031; 12.12.2012			
KA (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 7	130	7L	7L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 7	13	7L	7L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Piimašokolaad Panda Maito + <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 WDMC 00031; 24.02.2013			
TP S4 (S2-4 cfu 25 g kohta); korduseid 6	4	6L	6L
TP S1 (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,2	2EL; 4L	2EL; 4L
Piimašokolaad Panda Maito + <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 WDMC 00030; 12.12.2012 ja 12.02.2012			
KA (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 2	100	2L	2L
Negatiivne kontroll; korduseid 2	0	2EL	2EL
MA (S20-100) cfu 25 g kohta); korduseid 2	30	2L	2L
Tume šokolaad + <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 WDMC 00031; 09.12.2012			
KA (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 7	130	7L	7L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 7	13	7L	7L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Pralineekompvekid + <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 WDMC 00031; 12.12.2012			
KA (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 7	130	7L	7L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 7	13	7L	7L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Maitseainete kategooria			
Proovi tähis ja korduste arv	Nakatamisannus cfu/25 g maatriksi kohta	TULEMUS	
		REF	PCR
Tšillipipar + <i>Salmonella</i> Agona (VS003); 21.05.2013			
KA (S10-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	65	6L	6L
MA (S2-10 cfu 25 g kohta); korduseid 6	6,5	6L	6L
TP (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,3	2EL; 4L	2EL; 4L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Tšillipipar + <i>Salmonella</i> Derby (IS082); 10.04.2014			
TP S6 (S2-6 cfu 25 g kohta); korduseid 6	5	6L	6L
Tšillipipar Light + <i>Salmonella</i> Derby (VS005); 08.12.2013			
KA2 (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 6	240	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	60	6L	6L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 6	12	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL

Sibulapulber + <i>Salmonella</i> Derby (IS082) 10.04.2014			
KA (S10-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	50	6L	6L
MA (S2-10 cfu 25 g kohta); korduseid 6	5	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Lihatoodete kategooria			
Proovi tähis ja korduste arv	Nakatamisannus cfu/25 g maatriksi kohta	TULEMUS	
		REF	PCR
Toores sealiha + <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 WDMC 00030; 21.05.2013			
KA (S10-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	80	6L	6L
MA (S2-10 cfu 25 g kohta); korduseid 6	8	6L	6L
TP (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,8	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Ahjuvorstikesed astelpajupüreega + <i>Salmonella</i> Derby (VS008); 21.10.2013			
KA (S10-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	76	6L	6L
MA (S2-10 cfu 25 g kohta); korduseid 6	7,6	6L	6L
TP (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,6	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Lastevorst + <i>Salmonella</i> Newport (VS013); 21.10.2013			
KA (S10-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	61	6L	6L
MA (S2-10 cfu 25 g kohta); korduseid 6	6	6L	6L
TP (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,2	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Kanaliha kategooria			
Proovi tähis ja korduste arv	Nakatamisannus cfu/25 g maatriksi kohta	TULEMUS	
		REF	PCR
Grillkana + <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 WDMC 00030;17.03.2014			
KA2 (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 6	700	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	35	6L	6L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 6	14	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Grillkana + <i>Salmonella</i> Heidelberg (VS019); 10.04.2014			
MA (S2-6 cfu 25 g kohta); korduseid 6	4,5	6L	6L
TP (S1-2 cfu 25 g kohta); korduseid 6	1,8	6L	6L
Grillkana + <i>Salmonella</i> Heidelberg (VS019); 17.03.2013			
KA2 (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 6	750	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	75	6L	6L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 6	15	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Kanalihasüütl + <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 WDMC 00030; 17.03.2014			
KA2 (S100-1000 cfu 25 g kohta); korduseid 6	700	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu 25 g kohta); korduseid 6	35	6L	6L
MA (S10-20 cfu 25 g kohta); korduseid 6	14	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Proovi tähis ja korduste arv	Nakatamisannus cfu/11 g maatriksi kohta	TULEMUS	
		REF	PCR
Keskkonnaproovid + <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 WDMC 00030; 23.03.2013			
KA2 (S100-1000 cfu/ml); korduseid 6	720	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu/ml); korduseid 6	72	6L	6L
MA (S10-20 cfu/ml); korduseid 6	14,4	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Keskkonnaproovid + <i>Salmonella</i> Infantis (VS007); 23.03.2013			

KA2 (S100-1000 cfu/ml); korduseid 6	940	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu/ml); korduseid 6	47	6L	6L
MA (S10-20 cfu/ml); korduseid 6	18,8	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Keskkonnaproovid + <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 WDMC 00031; 31.03.2013			
KA2 (S100-1000 cfu/ml); korduseid 6	560	6L	6L
KA1 (S20-100 cfu/ml); korduseid 6	56	6L	6L
MA (S10-20 cfu/ml); korduseid 6	14	6L	6L
S0; korduseid 6	0	6EL	6EL
Keskkonnaproovid + <i>Salmonella</i> Infantis VS007; 10.04.2014			
MA (S2-6 cfu/ml); korduseid 6	4,5	6L	6L
TP(S1-2 cfu/ml); korduseid 6	1,5	6L	6L

EL - ei leitud; KA - kõrge arvukus; L - leitud; MA - madal arvukus; nak - nakatamata; nat-naturaalne; S0 - nakatamata proov; TP - tuvastamispiir

Lisa 5. Töös kasutatud varem kujundatud PCR programmid

PCR programmi nimi	„Salm”	16S rRNA (vana)	16S rRNA	PCR programmi nimi (astmeline programm)	„Salmst”
PCR termotsükleri kaane kuumutus 99°C	✓	✓	✓	Kaane kuumutus 99°C	✓
Eelkuumutus (hot-start) 95°C 15 min	✓	✓	✓	Eelkuumutus 95°C 15min	✓
Järgneva 3 etapi tsüklite arv	31	31	28	Järgneva 3 etapi tsüklite arv vastavlt astmele (a) *	1a– 5 tsüklit 2a– 5 tsüklit 3a– 24 tsüklit
DNA denaturatsioon	95°C 40 sek	95°C 1 min	95°C 1 min	DNA denaturatsioon vastavalt astmele (a)	1a– 96°C 30 sek 2a– 96°C 30 sek 3a– 96°C 30 sek
Praimerite seondumine	65°C 30 min	53°C 1 min	53°C 1 min	Praimerite seondumine vastavalt astmele (a)	1a– 70°C 30 sek 2a– 68°C 30 sek 3a– 65°C 30 sek
DNA süntees	72°C 40 sek	72°C 3 min	72°C 1 min	DNA süntees vastavalt astmele (a)	1a– 72°C 30 sek 2a– 72°C 30 sek 3a– 72°C 30 sek
DNA järelsüntees	72°C 5 min	72°C 10 min	72°C 10 min	DNA järelsüntees	72°C 5 min
PCR proovi jahutus	10°C HOLD	10°C HOLD	10°C HOLD	PCR proovi jahutus	10°C HOLD

Lisa 6. Referent- ja alternatiivmeetodi analüüsi tulemused selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramiseks; *Salmonella* märklaud ja mitte-märklaud tüved

Analüüsitava bakter ja päritolu	TULEMUSED			
	Referentmeetod		Alternatiivmeetod	
	Eeldatav tulemus	Tegelik tulemus	Eeldatav tulemus	Tegelik tulemus
Märklaudtüved (<i>Salmonella</i> spp. serotüübid)				
1. <i>Salmonella</i> Singapore (IS026, kookoshelbed)	Pos	Pos	Pos	Pos
2. <i>Salmonella</i> Cerro (Fepas, IS001, salat)	Pos	Pos	Pos	Pos
3. <i>Salmonella</i> Panama (LGC Standards, IS028, šokolaad)	Pos	Pos	Pos	Pos
4. <i>Salmonella</i> Derby (IS003, toorvorst lambasooles)	Pos	Pos	Pos	Pos
5. <i>Salmonella</i> Senegal (LGC Standards, IS029, šokolaad)	Pos	Pos	Pos	Pos
6. <i>Salmonella</i> Enterica subsp enterica (VTL 7686 grillvorst)	Pos	Pos	Pos	Pos
7. <i>Salmonella</i> Dublin (VTL 8006, veisemaks)	Pos	Pos	Pos	Pos
8. <i>Salmonella</i> Newport (VTL 8210, sealih)	Pos	Pos	Pos	Pos
9. <i>Salmonella</i> Typhimurium (VTL 8211, hamburgeri kotlet)	Pos	Pos	Pos	Pos
10. <i>Salmonella</i> Dublin (VTL 8212, veiselih)	Pos	Pos	Pos	Pos
11. <i>Salmonella</i> Derby (VTL 8234, grilllih)	Pos	Pos	Pos	Pos
12. <i>Salmonella</i> Heidelberg (VTL 8300, kalkunilih)	Pos	Pos	Pos	Pos
13. <i>Salmonella</i> Stanleyville (VTL 5333, pulbrilised tooted)	Pos	Pos	Pos	Pos
14. <i>Salmonella</i> Stanleyville (VTL 5637, pulbrilised tooted)	Pos	Pos	Pos	Pos
15. <i>Salmonella</i> Derby (VTL 6796, sealih)	Pos	Pos	Pos	Pos
16. <i>Salmonella</i> Typhimurium (VTL 6797, kotletilih)	Pos	Pos	Pos	Pos
17. <i>Salmonella</i> Infantis (VTL 6840, jahutatud sealih)	Pos	Pos	Pos	Pos
18. <i>Salmonella</i> Agona (VTL 7132, maitseained)	Pos	Pos	Pos	Pos
19. <i>Salmonella</i> Typhimurium (VTL 7157, linnulih)	Pos	Pos	Pos	Pos
20. <i>Salmonella</i> Enteritidis (VTL 7256, linnulih)	Pos	Pos	Pos	Pos
21. <i>Salmonella</i> Hadar (VTL 7260, kalkunilih)	Pos	Pos	Pos	Pos
22. <i>Salmonella</i> Enterica subsp Enterica (VTL 7298, uhteproov)	Pos	Pos	Pos	Pos
23. <i>Salmonella</i> Derby (VTL 7320, šašlökk)	Pos	Pos	Pos	Pos

24. <i>Salmonella</i> Typhimurium (VTL 7332, grilliliha)	Pos	Pos	Pos	Pos
25. <i>Salmonella</i> Enteritidis (VTL 7401, kana fileelõigud)	Pos	Pos	Pos	Pos
26. <i>Salmonella</i> Infantis (VTL 7402, broileriliha)	Pos	Pos	Pos	Pos
27. <i>Salmonella</i> Newport (VTL 7430, sealihha)	Pos	Pos	Pos	Pos
28. <i>Salmonella</i> Infantis (VTL 7498, uhtepuuv)	Pos	Pos	Pos	Pos
29. <i>Salmonella</i> Chartres (VTL 7538, hakkliha)	Pos	Pos	Pos	Pos
30. <i>Salmonella</i> Infantis (VTL 7666, seahakkliha)	Pos	Pos	Pos	Pos
Mitte-märklaudtüved				
1. <i>Serratia marcescens</i> (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
2. <i>Serratia proteomaculans</i> ABVal (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
3. <i>Citrobacter freundii</i> AL (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
4. <i>Citrobacter amalonaticus</i> P2 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
5. <i>Erwinia carotovora</i> 3111 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
6. <i>Pectobacterium atrosepticum</i> 1043 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
7. <i>Klebsiella oxytoca</i> PAU (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> P3 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
9. <i>Enterobacter cloacae</i> P4 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
10. <i>Enterobacter cloacae</i> P7 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
11. <i>Enterobacter aerogenes</i> (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
12. <i>Escherichia coli</i> EY (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
13. <i>Pseudomonas putida</i> 2D61 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
14. <i>Pseudomonas mendocina</i> PC1 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
15. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 2A50 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
16. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf01 (CELMS)	Neg	Neg	Neg	Neg
17. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 1774	Neg	Neg	Neg	Neg
18. <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	Neg	Neg	Neg	Neg
19. <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i> ATCC13883	Neg	Neg	Neg	Neg
20. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Neg	Neg	Neg	Neg
21. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	Neg	Neg	Neg	Neg
22. <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	Neg	Neg	Neg	Neg
23. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Neg	Neg	Neg	Neg
24. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Neg	Neg	Neg	Neg
25. <i>Escherichia coli</i> Dh5 α	Neg	Neg	Neg	Neg
26. <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 700814	Neg	Neg	Neg	Neg

27. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	Neg	Neg	Neg	Neg
28. <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	Neg	Neg	Neg	Neg
29. <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Neg	Neg	Neg	Neg
30. <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Neg	Neg	Neg	Neg

Pos - positiivne analüüsi tulemus; Neg - negatiivne analüüsi tulemus

Lisa 7. Meetodite suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja suhtelise spetsiifilisuse tulemused (2012 – 2014 aasta analüüside põhjal)

Kakao- ja šokolaaditooted	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Maatriks					PA + NA	$\frac{(PA + NA)}{N/100\%}$	PA + ND	$\frac{100\% \times PA}{N+}$	NA + PD	$\frac{100\% \times NA}{N-}$
Piimašokolaad	30	18	0	0	48	$\frac{48 \times 100\%}{48}$	30	$\frac{100\% \times 18}{18}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$
Tume šokolaad	14	16	0	0	30	$\frac{20 \times 100\%}{20}$	14	$\frac{100\% \times 14}{14}$	16	$\frac{100\% \times 16}{16}$
Pralineekompvek	14	6	0	0	20	$\frac{20 \times 100\%}{20}$	14	$\frac{100\% \times 14}{14}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Kategooria tulemused kokku	58	40	0	0	98	$\frac{98 \times 100\%}{98}$	58	$\frac{100\% \times 58}{58}$	40	$\frac{100\% \times 40}{40}$
Lihatoodete kategooria	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Toores sealiha	18	6	0	0	24	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Ahjuvorstikesed	18	6	0	0	24	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Lastevorst	18	6	0	0	24	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Kategooria tulemused kokku	54	18	0	0	72	$\frac{72 \times 100\%}{72}$	54	$\frac{100\% \times 54}{54}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$
Maitseainete kategooria	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Tšillipipar	22	8	0	0	30	$\frac{30 \times 100\%}{30}$	22	$\frac{100\% \times 22}{22}$	8	$\frac{100\% \times 8}{8}$
Tšillipipar Light	18	6	0	0	24	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Sibulapulber	12	6	0	0	18	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	12	$\frac{100\% \times 12}{12}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$
Kategooria tulemused kokku	52	20	0	0	72	$\frac{72 \times 100\%}{72}$	52	$\frac{100\% \times 52}{52}$	20	$\frac{100\% \times 20}{20}$
Kanaliha toodete kategooria	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Grillkana	48	12	0	0	60	$\frac{48 \times 100\%}{48}$	48	$\frac{100\% \times 48}{48}$	12	$\frac{100\% \times 12}{12}$
Kanaliha sült	18	6	0	0	24	$\frac{24 \times 100\%}{24}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$	6	$\frac{100\% \times 6}{6}$

Kategooria tulemused kokku	66	18	0	0	84	$\frac{84 \times 100\%}{84}$	66	$\frac{100\% \times 66}{66}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$
Keskkonna-proovide kategooria	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Abrasiivne käsn	66	18	0	0	84	$\frac{84 \times 100\%}{84}$	66	$\frac{100\% \times 66}{66}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$
	PA	NA	ND	PD	Σ	<u>AC (%)</u>	N+	<u>SE (%)</u>	N-	<u>SP (%)</u>
Kategooria tulemused kokku	66	18	0	0	84	$\frac{84 \times 100\%}{84}$	66	$\frac{100\% \times 66}{66}$	18	$\frac{100\% \times 18}{18}$
Kategooriate tulemused kokku	296	114	0	0	410	$\frac{410 \times 100\%}{410}$	296	$\frac{100\% \times 296}{296}$	74	$\frac{100\% \times 114}{114}$

AC - suhteline täpsus; NA - negatiivsete tulemuste arv; ND - negatiivne hälve; PA - positiivsete tulemuste arv; PD - positiivne hälve; SE - suhteline tundlikkus; SP - suhteline spetsiifilisus

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks, publitseerimisel piirangud

Mina Markus Pappa

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 25.04.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „PCR-meetodi valideerimine *Salmonella spp.* tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest” (lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Ene Talpsep ja Eerik Jõgi,
(juhendaja nimi)

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 22.08.2014 (kuupäev)